
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Fachbereich Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Vogt)
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**„Vorkommen, Bedeutung und klinische Relevanz von spezifischen IgE-Antikörpern
gegenüber rekombinanten Allergenen aus Insektengift bei Patienten mit
Insektengiftallergie“**

*Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Zahnmedizin an der
Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2015

vorgelegt von: Stefan Frank Küffner
geboren am: 06.10.1980
in: Frankfurt am Main

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
1.1 Summary	4
1.2. Zusammenfassung	7
 2. Einleitung	 10
2.1. Das Immunsystem und die physiologische Immunantwort	10
2.2. Hymenopterengiftallergie	12
2.3. Vom Allergen zum rekombinanten Allergen	15
2.4. Diagnostische Verfahren	17
2.4.1. Serologische Untersuchungen	17
2.4.2. Hautuntersuchungen	18
2.5. Therapie	19
2.6. Ziel der Arbeit	21
 3. Material und Methoden	 23
3.1 Dokumentation und Quellen	23
3.2. Erhobene Daten	23
3.3. Patientenkollektiv	24
3.4. Diagnostik	26
3.4.1. Immunoassays	27
3.4.2. ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific Inc.)	28
3.4.3. Intrakutantest	28
3.4.4. CAST ® ELISA (Bühlmann Laboratories AG)	29
3.5. Statistische Auswertung	30

4. Ergebnisse	31
4.1. Allgemeines	
4.2. Häufigkeitsverteilung von spezifischen IgE-Antikörpern gegen rekombinante Allergene bei Patienten mit Hymenopterenallergie	32
4.2.1. Häufigkeitsverteilung bei den Bienengiftallergikern	32
4.2.2. Häufigkeitsverteilung bei den Wespengiftallergikern	34
4.3. Sensitivität und Spezifität der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rekombinante Allergene bei den Allergikern	35
4.3.1. rApi m1 bei Bienengiftallergikern	35
4.3.2. rVes v5 bei Wespengiftallergikern	36
4.3.3. rPol d5 bei Wespengiftallergikern	37
4.3.4. rVes v5 und rPol d5 bei Wespengiftallergikern	38
4.4. Häufigkeitsverteilung der absoluten Werte der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene bei Allergikern mit CAP Klasse 0	40
4.4.1. Bienengiftallergiker mit CAP Klasse 0 für rApi m1	40
4.4.2. Wespengiftallergiker mit CAP Klasse 0 für rVes v5	41
4.4.3. Wespengiftallergiker mit CAP Klasse 0 für rPol d5	42
4.5. Statistische Kennwerte zu Alter und Geschlecht der Allergiker	45
4.6. Zusammenhang zwischen Alter bzw. Geschlecht und den spezifischen IgE-Antikörpern gegenüber rekombinanten Allergenen bei den Allergikern	45
4.6.1. Zusammenhang mit dem Geschlecht	45
4.6.2. Zusammenhang mit dem Alter	46
4.7. Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Intrakutantests und der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene bei den Allergikern	47

4.8	Zusammenhang zwischen spezifischen IgE-Antikörpern gegen das Gesamtgift und spezifischen IgE-Antikörpern gegen die rekombinanten Allergene bei den Allergikern	48
4.9.	Zusammenhang zwischen Ergebnis CAST-ELISA und den spezifischen IgE- Antikörpern gegen die rekombinanten Allergene bei den Allergikern	49
4.10.	Zusammenhang der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinante Allergene und dem Grad der Symptome bei den Allergikern	50
5.	Diskussion	51
6.	Anhang	57
6.1.	Auswertungstabelle	57
6.2.	Abkürzungen	60
7.	Literaturverzeichnis	61
8.	Dank	69

1. Zusammenfassung

1.1 Summary

Since the cDNA of allergens became available in 1988/89 and being able to produce *in vitro* clone allergens, research focused on decoding and studying the DNA sequences of a large number of allergens. It became evident that allergens are mainly heterogenic peptide and carbohydrate combinations in which the different components cause different degrees of allergic reactions in patients. Studies revealed which components where to be seen as major- and minorallergens in different allergens based on statistical analysis of the patients reactions to the allergen components. These major- and minorallergens where called recombinant allergens and in the field of CRD (component resolved diagnostics) the main goal became to decode allergens and find the relevant major- and minorallergens. The advantage of this approach is that recombinant allergens are allergen-specific and contamination free.

Up to today it is not possible to diagnose allergies with recombinant allergens alone because sensitivity results in studies are not high enough. Yet, they have become valuable when it comes to distinguish between real double sensitivity and cross reaction based double positive test results in patients with hymenoptera venom allergy that can be caused by the very similar molecular structure between the hymenoptera venoms and also identical carbohydrates (CCDs) in the venoms. Efforts are being made to use a higher number of recombinant allergens to get better results concerning the test sensitivity. For the honeybee venom, rApi m1 is still regarded as the major recombinant allergen as it is rVes v5 for yellow jacket venom. In this study rPol d5 as an additional recombinant allergen of yellow jacket venom was also studied and evaluated.

In this retrospective study with 114 patients of which 100 patients (87,72 %) where diagnosed with honeybee- or/and wasp venom allergy, the occurrence, meaning and clinical relevance of specific IgE antibodies against rApi m1, rVes v5 and rPol d5 was studied and evaluated. Sensitivity and specificity of the tests as well as commonness and correlations of the specific IgE antibodies against these recombinant allergens

and sexes, different age groups the degree of the allergic symptoms as well as established diagnostic methods were examined.

Ninety of the 100 patients with hymenoptera-venom allergy were allergic against yellow jacket venom (90 %). The sensitivity of the tests with the recombinant allergen rVes v5 was 88,76 %, with valid data of 89 patients. For rPol d5 there was valid data for 86 patients and the sensitivity was 67,77 %. The patient group with honeybee-venom allergy was the smallest including 13 patients, all with valid data. The sensitivity for rApi m1 was 92,31 %. In conclusion rPol d5 is least valuable for diagnostics and for rApi m1 it has to be considered that there was only a small group of 13 patients with honeybee venom allergy when looking at the sensitivity results.

Besides sensitivity, which already indicates that diagnostics with recombinant allergens alone is not sufficient, the absolute concentration of the specific IgE antibodies against the recombinant allergens was also studied and evaluated. Concerning the occurrence of these specific IgE antibodies the study shows that one patient (7,69 %) diagnosed with honeybee venom allergy did not have any significant specific IgE antibodies against the recombinant allergen rApi m1 (0,01 kU/l). The same applied to patients with yellow jacket venom allergy. Four patients (4,44 %) of this group had no specific IgE antibodies against the recombinant allergens rVes v5 or rPol d5 at all (0,00 kU/l). Further, looking at patients with honeybee venom allergy, 5 patients (38,46 %) had specific IgE antibodies against rPol d5 and 6 patients (46,15 %) had specific IgE antibodies against rVes v5. In the group of patients with yellow jacket venom allergy, 7 patients (7,96 %) had specific IgE antibodies against rApi m1. It could be demonstrated, that neither the absence nor the presence of specific IgE antibodies against the studied specific recombinant allergens allow to safely diagnose or exclude wasp- or honeybee venom allergy.

Concerning correlations there was a tendency ($p=0.059$) of the male group to be statistically more often sensitized against the recombinant allergen rPol d5 than females.

The available data show that specific IgE antibody reactions against rApi m1, rVes v5 and rPol d5 alone are not applicable to diagnose patients with hymenoptera venom allergy. Until now recombinant allergen diagnostics are still only a valuable method to distinguish between double sensitivity and cross reactions in patients with

hymenoptera venom allergy. Further studies with more patients and a higher number of recombinant allergens are warranted to make *in vitro* diagnostics of allergies possible in the future.

1.2. Zusammenfassung

Seit 1988/89 die cDNA von Allergenen verfügbar wurden und man Allergenklone *in vitro* herstellen konnte, konzentrierte sich die Forschung auf die Entschlüsselung von Allergenen auf molekularer Ebene und man fand heraus, dass Allergene meistens ein Konglomerat verschiedener Peptide und Kohlenhydrate sind, deren Einzelbestandteile unterschiedlich stark allergen wirken. So fing man an, in Studien Major- und Minorallergene zu unterscheiden, wobei die Bezeichnung hier nach den statistischen Häufigkeiten der Allergenepitope, die eine Antikörperreaktion auslösen, gewählt wurde. Diese Major- und Minorallergene wurden rekombinante Allergene genannt und die Forschung machte es sich in der Komponenten-basierten Diagnostik zum Ziel, Allergene molekular zu trennen und Allergiker auf deren Sensibilität gegen die einzelnen Bestandteile der Allergene zu testen. Der Vorteil der rekombinanten Allergene ist, dass sie allergenspezifisch und frei von Verunreinigungen sind. Die Liste der bekannten rekombinanten Allergene ist inzwischen lang, doch bisher ist es nicht gelungen, dass rekombinante Allergene die Gesamtallergene und klinischen Tests in der Praxis ersetzen können. Hierzu ist die Sensitivität der Testergebnisse noch zu schlecht. Dennoch haben sie inzwischen in der Diagnostik bereits eine wichtige Funktion, wenn es darum geht, echte Doppelsensibilisierungen gegen z.B. Hymenopterengifte von Kreuzreaktionen aufgrund sehr ähnlicher Allergenbestandteile und Kohlenhydratketten (CCDs) in den Giften zu unterscheiden, die ebenfalls allergen wirken. Man versucht inzwischen über ein breiteres Spektrum an rekombinanten Allergenen die diagnostischen Ergebnisse zu verbessern. Beim Bienengift gilt rApi m1 und beim Wespengift rVes v5 allerdings nach wie vor als das wichtigste Majorallergen bzw. rekombinante Allergen. In dieser Studie wurde zusätzlich rPol d5 als weiteres rekombinantes Allergen des Wespengiftes untersucht.

In dieser retrospektiven Studie mit 114 Patienten von denen 100 Patienten (87,72 %) eine diagnostizierte Bienen- oder/und Wespengiftallergie hatten, wurde das Vorkommen, die Bedeutung und die klinische Relevanz der spezifischen IgE-Antikörper gegenüber den rekombinanten Allergenen rApi m1, rVes v5 und rPol d5 untersucht. Dabei wurden die Sensitivität und die Spezifität, sowie Häufigkeiten und

Zusammenhänge der spezifischen IgE-Antikörper gegen diese rekombinanten Allergene zwischen den Geschlechtern und der verschiedenen Altersgruppen, dem Grad der klinischen Symptome und etablierter diagnostischer Verfahren analysiert.

Von den 100 Allergikern im Patientenkollektiv gab es 90 Wespengiftallergiker (90 %). Die Sensitivität bei der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rVes v5 betrug 88,76 %, wobei es hier von 89 Patienten Daten für die Auswertung gab. Bei rPol d5 gab es von 86 Patienten auswertbare Daten und die Sensitivität lag bei 67,44 %. Die Bienengiftallergiker stellten mit 13 Patienten die kleinste Gruppe dar mit einer Sensitivität von 92,31% bei rApi m1. rPol d5 ist somit für die Diagnostik am wenigsten geeignet und bei dem rekombinanten Allergen rApi m1 ist zu bedenken, dass die Fallzahl nur 13 betrug.

Zusätzlich zu der Sensitivität, die bereits impliziert, dass eine Untersuchung der Antikörper gegen die rekombinanten Allergene keine ausreichende diagnostische Sicherheit bringt, wurden die absoluten Konzentrationen der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene untersucht. In Bezug auf das Vorkommen dieser Antikörper konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass es bei den Bienengiftallergikern einen Patienten gab (7,69 %), der eine kaum nachweisbare Menge an spezifischen IgE-Antikörpern gegen rApi m1 im Blut hatte (0,01 kU/l). Bei den Wespengiftallergikern gab es 4 Patienten (4,44 %), die gar keine spezifischen IgE-Antikörper gegen die entsprechenden rekombinanten Allergene rVes v5 bzw. rPol d5 hatten (0,00 kU/l). Außerdem zeigte sich, dass Patienten, die ausschließlich gegen Bienengift allergisch waren, zu 38,46 % spezifische IgE-Antikörper gegen rPol d5 (n=5) und zu 46,15 % (n= 6) gegen rVes v5 aufwiesen. Ähnliches gilt für die Wespengiftallergiker. Hier hatten 7,96 % (n=7) der Wespengiftallergiker spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rApi m1 im Blut. Es konnte somit gezeigt werden, dass weder durch das Vorkommen, noch durch das Fehlen der entsprechenden spezifischen IgE-Antikörper gegenüber den untersuchten rekombinanten Allergene eine sichere Diagnose gestellt-, bzw. eine Allergie ausgeschlossen werden kann.

Bei den Geschlechtern gab es eine Tendenz ($p=0.059$), dass die Männer im Patientenkollektiv häufiger gegen das rekombinante Allergen rPol d5 sensibilisiert sind als die Frauen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Untersuchung der spezifischen IgE-Antikörperreaktion gegenüber rApi m1, rVes v5 und rPol d5 keine ausreichende Sicherheit bringen, um Patienten mit Hymenopterenallergie richtig zu diagnostizieren. Die heutige Bedeutung der rekombinanten Allergene liegt noch in der Differentialdiagnostik, um echte Doppelsensibilisierungen von Kreuzallergien differenzieren zu können. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl an rekombinanten Allergenen sind zu befürworten, um zukünftig eine *in vitro* Allergiediagnostik zu ermöglichen.

2. Einleitung

2.1. Das Immunsystem und die physiologische Immunantwort

Man kann zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem unterscheiden. Es handelt sich hierbei um ein sich im Austausch befindliches System zwischen im Blut vorkommenden Zellen - wie Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Proteinen - mit gewebeständigen Zellen wie Makrophagen und Mastzellen. Es gibt eine zelluläre und eine humorale Komponente (SASLAW S et al. 1946).

Die unspezifische Abwehr besteht aus phagozytierenden und sekretorischen, zytotoxischen Zellen. Mastzellen und basophile Granulozyten gehören zu den sekretorischen, gewebsständigen Zellen, die eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion spielen und bei allergischen Symptomen maßgeblich beteiligt sind (COMAISH 1965).

Lymphozyten gehören zur spezifischen Abwehr und leiten sich von lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Sie differenzieren sich später zu den B-Lymphozyten, die sich weiter im Knochenmark entwickeln und den T-Lymphozyten, die sich im Thymus weiterentwickeln (MILLER et al. 1961). Diese spezifische Abwehr muss zunächst aktiviert werden. Allerdings ist die Immunantwort anschließend besonders effektiv (JERNE 1974).

Antigene sind meistens Proteine, aber auch Kohlenhydrate, Toxine oder Lipide und andere Stoffe, die als körperfremd erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen (MARRACK 1934). Sie befinden sich beispielsweise auf Bakterienoberflächen und Viren oder sind Teil von anderen körperfremden Strukturen. B-Lymphozyten sind in der Lage, Antigene direkt zu binden (FAGRAEUS 1948), während T-Lymphozyten zuerst über antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden müssen (ZINKERNAGEL 1976). Eine Aktivierung führt zur Einleitung der Zellteilung. Lymphozyten besitzen eine hohe genetische Vielfalt was Ihre Rezeptoren angeht, wobei jeder Lymphozyt nur einen Typ von Rezeptoren trägt. Die Vielfalt der Rezeptoren entsteht durch eine Vielzahl an Zellen. Werden B-Lymphozyten aktiviert, wandeln sie sich in Plasmazellen um, die Klone des aktivierten

Lymphozyten bzw. der Rezeptoren - die Immunglobuline - bilden und sezernieren. (FAGRAEUS 1948)

Diese Antikörper bzw. Immunglobuline gehören zum humoralen Anteil des Immunsystems (BURNET 1957). Die Immunglobuline binden an die Antigene und markieren sie. Die Markierung führt in der Regel zur Opsonierung der Zielzelle und lockt damit phagozytierende und zytotoxische Zellen an (SHIKU et al. 1975)

Die Antikörper setzen sich aus zwei variablen antigenbindenden Regionen und einer konstanten Region zusammen. Anhand des konstanten Teils werden die verschiedenen Immunglobulinklassen - oder auch Isotypen – unterschieden (PORTER 1963). Auch Strukturell sind die Isotypen unterschiedlich aufgebaut. Man unterscheidet IgM, IgD, IgG, IgA und IgE.

B-Lymphozyten exprimieren zunächst IgM und IgD. Erst nach Aktivierung kann es zu einem Isotypenswitch kommen - einer somatischen Rekombination im Bereich der C-Gene - die den konstanten Teil des Antikörpers kodieren. Die Zellen synthetisieren danach IgA, IgG oder IgE (TONEGAWA et al. 1974).

Bei Protein-Antigenen nimmt ein B-Lymphozyt ein an den Rezeptor gebundenes Antigen auf, spaltet es im Zellinneren und präsentiert die Fragmente an der Zelloberfläche. Da es sich um Peptidbestandteile eines Proteins handelt, gibt es nun zahlreiche Epitope bzw. verschiedene Bindungsstellen an der Membranoberfläche (AURIAULT C et al. 1988). T-Helferzellen binden dann an diese Epitope und sezernieren Botenstoffe, die T-Lymphozyten anlocken. T-Lymphozyten mit passenden Rezeptoren binden an den Komplex und es kommt zu einer Aktivierung und Zellvermehrung der entsprechenden T-Lymphozyten. Es besteht hier eine Interaktion zwischen B- und T-Lymphozyten (FELDMANN 1972). Zytotoxische T-Zellen zerstören dabei markierte Zellen (KIESSLING et al. 1975), regulatorische T-Zellen verhindern über Botenstoffe eine überschießende Immunreaktion (SAKAGUCHI 1996).

Bei nicht-Protein-Antigenen erfolgt die Immunantwort ohne T-Lymphozyten, da es sich hier um repetitive Epitope – beispielsweise Kohlenhydrate - handelt, die die B-Lymphozyten-Rezeptoren kreuzvernetzen und so zur Aktivierung der B-Lymphozyten zu IgM sezernierenden Plasmazellen führt (FAGRAEUS 1948).

2.2. Hymenopterenallergie

Eine Allergie ist eine Erkrankung, die durch eine Immunreaktion gegen sonst harmlose Antigene (Allergene) ausgelöst wird und eine Überreaktion des Immunsystems darstellt (KNEASS 1909). Es gibt eine Einteilung allergischer Reaktionen in vier Kategorien (I-IV) nach GELL und COOMBS 1963. Man unterscheidet die Typ-I-Allergie (Sofort-Typ), die Typ-II-Allergie (Zytotoxischer Typ), die Typ-III-Allergie (Immunkomplex-Typ) und die Typ-IV-Allergie (Spättyp). Unter der klassischen Allergie im engeren Sinn versteht man die IgE-vermittelte Typ-I-Allergie (YUNGINGER und GLEICH 1975), die im Zentrum dieser Arbeit steht. Die Symptome treten innerhalb von Sekunden bis Minuten, selten nach Stunden auf. Klinisch ist die Einteilung in Schweregrade I-IV nach RING und MESSMER 1977 gängig. Die Klassifikation erfolgt nach den schwersten aufgetretenen Symptomen, kein Symptom ist obligat. (Abb.2)

Grad	Haut	Abdomen	Respirationstrakt	Herz-Kreislauf
I	- Juckreiz - Flush - Urtikaria - Angioödem	-	-	-
II	- Juckreiz - Flush - Urtikaria - Angioödem	- Nausea - Krämpfe	- Rhinorrhö - Heiserkeit - Dyspnoe	- Tachykardie (Anstieg ≥ 20 /min) - Hypotonie (Abfall ≥ 20 mmHg systolisch) - Arrhythmie
III	- Juckreiz - Flush - Urtikaria - Angioödem	- Erbrechen - Defäkation	- Larynxödem - Bronchospasmus - Zyanose	- Schock
IV	- Juckreiz - Flush - Urtikaria - Angioödem	- Erbrechen - Defäkation	- Atemstillstand	- Kreislaufstillstand

Abb. 2 : Tabellarische Schweregradskala Klassifikation anaphylaktischer

Reaktionen nach RING und MESSMER. Quelle: : PRZYBILLA et al. 2011

Leitlinien Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie, *Allergo J* 20: 318-39

Die Eintrittspforte für Hymenopterengift in den Körper ist die Haut oder die Schleimhaut, die durch den Stich durchdrungen wird.

B-Lymphozyten, die durch die eindringenden Allergene aktiviert werden, werden zu Plasmazellen und fangen an IgE-Antikörper zu bilden, die dann an die Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten binden. Der Körper ist jetzt sensibilisiert gegen das Allergen. Bei einem erneuten Kontakt binden die IgE-Antikörper an das Allergen und kreuzvernetzen die Mastzellen bzw. basophile Granulozyten. Es kommt zur Degranulation wobei Histamin, Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane zusammen mit einer Reihe von Enzymen freigesetzt werden (FRICK 1967). Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene sind Entzündungsmediatoren. Sie wirken lokal begrenzt und kurzzeitig. Histamin spielt die wichtigste Rolle bei der allergischen Reaktion. Das biogene Amin wirkt hauptsächlich über drei Rezeptoren im Körper (GESPACH et al. 1989). Am H1 Rezeptor führt es zu Juckreiz, Schmerzen, Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung von Gefäßen, sowie Erhöhung der Darmperistaltik. An den H2 Rezeptoren wirkt es positiv chronotrop und inotrop auf das Herz und es kommt zur Vasodilatation und vermehrter Magensäureproduktion. Am H3 Rezeptor wirkt es hauptsächlich zerebral und kann u.a. zu Krampfanfällen führen (ARANG et al. 1983).

Die im Bienen- oder Wespengift enthaltenen Allergene sind vor allem biogene Amine und Enzyme, also körperfremde Proteine, die eine allergische Sofortreaktion vom Typ I bei Allergikern auslösen. Die Symptome reichen von relativ harmlosen Hautreaktionen wie Rötung, Schwellung, Quaddelbildung und Juckreiz durch die von den Mediatoren und dem Histamin ausgelöste Vasodilatation der Gefäße und Erhöhung der Gefäßpermeabilität bis hin zu gastrointestinalen Symptomen und dem Vollbild des anaphylaktischen Schocks (PRZYBILLA et al. 2010). Bei Anschwellung der Zunge kann es zur respiratorischen Insuffizienz mit Auswirkung auf das gesamte Herz-Kreislaufsystem kommen. Die Wirkung auf das Herzkreislaufsystem kann sich durch Arrhythmien, Tachykardie und Hypotonie, ausgelöst durch das Histamin, äußern. Diese kardiovaskuläre Insuffizienz kann bis hin zum Herz-Kreislaufstillstand und zum Tod führen (PRZYBILLA et al. 2010).

Nach einem Bienen- oder Wespenstich tritt eine gesteigerte örtliche Reaktion bei 2,4 bis 26,4% in der Allgemeinbevölkerung auf (BILÓ et al. 2005). In Studien konnte eine Insektengiftsensibilisierung bei bis zu 25% unter der Erwachsenenbevölkerung und bis zu 50% bei Kindern ermittelt werden (SCHÄFER 2009). Systemische Reaktionen auf Hymenopterenstiche treten laut bei 1,2 bis 3,5% der Allgemeinbevölkerung auf (SCHÄFER 2009). Es gibt in Deutschland jährlich mindestens 20 Todesfälle infolge eines Wespen-, Bienen oder Hornissenstiches, wobei die tatsächliche Zahl höher liegen dürfte, weil die Todesursache in Folge eines Hymenopterenstiches oft nicht erkannt wird (PRZYBILLA et al. 2007).

2.3. Vom Allergen zum rekombinanten Allergen

Die erste Studie mit Graspollenextrakt zur Anwendung in der Therapie von Heuschnupfen mittels spezifischer Immuntherapie (SIT) wurde bereits 1911 publiziert und stammt von LEONARD NOON. Seitdem gab es zahlreiche Studien und Verbesserungsversuche in der Gewinnung von Allergenextrakten und den Methoden der Anwendung, wobei die größte Herausforderung stets war, Verunreinigungen der Proben so gering wie möglich zu halten, um die anfangs schlechte Effektivität der SIT zu steigern und Nebenwirkungen immer weiter zu minimieren. Es waren damals weder die Pathomechanismen noch die genauen Mechanismen der SIT bekannt. Ein Durchbruch gelang 1988/89 mit der Verfügbarkeit Allergen-codierender cDNA (FANG et al. 1988) und der Herstellung isolierter Allergenklone. Im Feld der CRD (component resolved diagnostics) wurde die Erforschung und Isolierung der allergieauslösenden Epitope innerhalb der Allergene - der rekombinanten Allergene - und der allergenspezifischen zellulären Immunantwort untersucht. Ab 1994 gab es die ersten Studien, bei denen ein Vergleich von *in vivo* Provokationstests mit rekombinanten Allergenen und natürlichen Allergenextrakten durchgeführt wurde, um deren Wirksamkeit für die Klinik bzw. bei der *in vivo* Diagnose beurteilen zu können. Die Ergebnisse zeigten, dass rekombinante Allergene natürliche Allergenextrakte auch *in vivo* ersetzen können (MOSER et al. 1994). Die erste erfolgversprechende doppelblind- und placebokontrollierte Studie zur Ermittlung der Effektivität unter Beobachtung der Nebenwirkungen bei einer SIT mit rekombinanten Allergenen mit dem Major Birkenpollenallergen Bet v 1 wurde 2004 publiziert (NIEDERBERGER et al. 2004). Rekombinante Allergene werden heute mit standardisierten Methoden hergestellt und als Referenzsubstanzen von Allergenen betrachtet (VAN REE R et al. 2008). Inzwischen sind bei einer großen Anzahl an Extrakten die rekombinanten Allergene bekannt und stehen kommerziell zur Verfügung. Bei doppelt positiven Allergietests auf Bienen- und Wespengift kann eine echte Doppelsensibilisierung vorliegen, oder eine Kreuzreaktion aufgrund der sehr ähnlichen Giftzusammensetzung oder Kohlenhydratketten in den Giften, die nach HEMMER 2008 ebenfalls allergen wirken, den sog. cross-reactive carbohydrate determinants (CCD). Hier kann mithilfe der rekombinanten Allergene differenziert- und eine bessere Diagnostik durchgeführt werden.

In Bienengift wurde rApi m1 und in Wespengift rVes v5 als Majorallergen identifiziert (MÜLLER et al. 2009). Sie sind frei von Verunreinigungen sowie CCDs und giftspezifisch.

Die Allergiediagnostik basiert allerdings bis heute hauptsächlich auf der Messung spezifischer IgE-Antikörper gegen die Allergenextrakte, sowie Intrakutantests. Dieses Verfahren ist momentan noch zuverlässiger und die CRD noch nicht ausgereift. In Zukunft hofft man jedoch, routinemäßig mittels der rekombinanten Allergene exakte Allergieprofile von Patienten erstellen zu können und in der SIT gezielt gegen spezifische Allergeniso­tope desensibilisieren zu können. Die Herstellung von Impfstoffen ist ebenfalls in der Entwicklung (VALENTA et al. 2012).

Bisherige Studien zeigten bei rVes v5 zwar eine gute Sensitivität mit 84.5% diagnostizierten Allergikern (KOROŠEC et al. 2012), bei dem Majorallergen rApi m1 allerdings unbefriedigende Ergebnisse mit 57% diagnostizierten Allergikern (KOROŠEC et al. 2011). Da beide Gifte etliche rekombinante Allergene enthalten und die in vitro CRD noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigte, hat man angefangen, sich nicht nur auf die jeweiligen Majorallergene alleine zu konzentrieren, sondern weitere giftspezifische rekombinante Allergene in der CRD zu untersuchen. Eine aktuelle Studie von KÖHLER et al. 2014 zeigt, dass bei der Biene neben rApi m1 auch rApi m3, 5 und 10 als Majorallergene betrachtet werden sollten. Eine Kombination von rApi m 1, 2, 3, 5 und 10 sowie nApi m 4 konnte in dieser Studie 94.4 % der Allergiker diagnostizieren, wobei einige Probanden nicht auf das Majorallergen rApi m1, sondern ausschließlich auf rApi m3 und 10 allergisch waren. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch von unabhängigen Studien bestätigt werden. Auch beim Wespengift konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Allergen rVes v 1 die CRD verbessert (KOROŠEC et al. 2012).

2.4. Diagnostische Verfahren

Ein Patient mit der Anamnese einer Anaphylaxie nach einem Bienen- oder Wespenstich wird im Patientengespräch zunächst gefragt, wieviel Zeit vom Stich bis zu den ersten Symptomen vergangen ist, wie viele Stiche es waren, welche Symptome aufgetreten sind, wie der Patient bei früheren Stichen reagiert hat und ob der Stachel steckengeblieben ist bzw. welches Insekt gestochen hat. Auch die Umstände des Stiches, sowie ein beruflich erhöhtes Risiko, wie z.B. bei Imkern, werden erfasst. Es folgen serologische Untersuchungen, sowie ein Intrakutantest und, falls nötig, ein CAST-ELISA Test.

2.4.1. Serologische Untersuchungen

Nach Blutabnahme wird die Konzentration der spezifische IgE-Antikörper gegen Bienengift- und Wespengiftextrakt sowie gegen die rekombinanten Allergene rApi m1, rVes v5 und rPol d5 gemessen. Außerdem wird die Serumtryptasekonzentration, die gesamt IgE-Konzentration, sowie die Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegenüber Meerrettichperoxidase, die eine CCD darstellt.

Die Tryptase wird als Mediator hauptsächlich von Mastzellen sezerniert und die basale Serumtryptasekonzentration ist maßgeblich für den Grad der Symptome nach RING und MESSMER 1977 bei einer Anaphylaxie verantwortlich. Ist dieser Wert erhöht, verlaufen die anaphylaktischen Reaktionen häufig schwer. (Ruëff et al. 2006)
Die Gesamt-IgE-Konzentration ist im Blut wesentlich geringer als die der anderen Immunglobuline. Ist der Wert erhöht, kann eine Atopie vorliegen, eine Disposition zur allergischen Reaktion. (STURM et al. 2009)

Der wichtigste Laborparameter zur Diagnosestellung einer Allergie ist die spezifische IgE-Konzentration gegen das Gesamtgift des Insekts. Ab einer Antikörperkonzentration von $\geq 0,35$ kU/l der spezifischen IgE-Antikörper gegen das Allergen ist der Test positiv. Lassen sich spezifische IgE-Antikörper gegen das Bienengift und das Wespengift in einer Konzentration $\geq 0,35$ kU/l nachweisen, kann es sich um eine echte Doppelsensibilität gegen Bienen- und Wespengift handeln,

oder um eine Kreuzreaktion, bei der die Antikörper an Epitope binden, die in beiden Giften vorkommen, wie z.B. die Hyaluronidase oder Kohlenhydratketten (CCD) in den Giften (HEMMER 2008).

Bei Doppelsensibilisierungen wird daher auch die Bestimmung der spezifischen IgE- Antikörper gegen CCD mittels Meerrettichperoxidase, Bromelain oder Ascorbatoxidase empfohlen. Hier handelt es sich um CCD haltige Screeningallergene. Eine solche Inhibitionstestung kann die Testspezifität verbessern. (EBERLEIN et al 2012)

Bei unklaren Fällen wird ggf. ein CAST-ELISA Test durchgeführt, bei dem Leukotriene, die bei einer allergischen Reaktion von basophilen Granulozyten freigesetzt werden, gemessen werden. (SCHERER et al. 2008)

2.4.2. Hautuntersuchungen

Zur Absicherung der Diagnose bei Verdacht auf eine Allergie nach Anamnese und Labor folgt ein Intrakutantest. Hier wird das entsprechende Allergenextrakt in steriler Lösung direkt unter die Haut gespritzt. Zur Referenzkontrolle werden Histamin (Positivkontrolle) und eine physiologische Kochsalzlösung (Negativkontrolle) intrakutan gespritzt. Nach 20 Minuten kann das Ergebnis ausgewertet werden. Es werden Hautrötungen, Quaddelgröße und Juckreiz beurteilt. Antihistaminika und Kortikosteroide müssen vor dem Test abgesetzt werden, da sie das Testergebnis verfälschen würden bzw. eventuell falsch negative Ergebnisse verursachen würden. Falls der Intrakutantest positiv ist, wird in Zusammenschau mit der Anamnese die Indikation zur Hyposensibilisierungs-therapie gestellt (BONIFAZI et al. 2005).

Der Intrakutantest birgt das Risiko einer anaphylaktischen Reaktion, was insbesondere bei Risikopatienten zu beachten ist. Zu der Risikopatientengruppe gehören nach Ruëff et al. 2009 u.a. Patienten mit kardiovaskulären Grunderkrankungen, Asthma bronchiale, Pharmakotherapie mit β -Blockern oder ACE-Hemmern und nicht-steroidalen Antirheumatika, physischer oder psychischer Belastung sowie erhöhter basalen Serumtryptase. Ältere Patienten und Kleinkinder gelten ebenfalls als Risikopatienten.

2.5. Therapie

Akute Beschwerden werden symptomatisch behandelt (RING et al. 2007). Es werden Antihistaminika eingesetzt. Hier kommen vor allem H1-Antagonisten sowie Kombinationspräparate von H1- und H2- Antagonisten der neuesten Generation zum Einsatz. Sie wirken als kompetitive Antagonisten sehr spezifisch an den Histaminrezeptoren. Die Symptome klingen meist schnell ab. Zusätzlich kommen Kortikoide in hohen Dosen zum Einsatz, um die allergischen Symptome schnellstmöglich zu unterbinden (RING et al 2007). Es kommt durch einen direkten Effekt an membranständigen Rezeptoren zu einer unmittelbaren Wirkung, indem unter anderem die Zellmembran stabilisiert und die Bildung vasoaktiver Stoffe verhindert wird (COUTINO und CHAPMAN 2011). Die Gefäßpermeabilität nimmt ab, Schwellungen vermindern sich. Zusätzlich können Mastzellenstabilisatoren eingesetzt werden, die die Degranulation, und somit die Freisetzung der Entzündungsmediatoren, durch Inhibition membranständiger Calciumkanäle unterbinden (COOK et al. 2002).

Kommt es zu einer generalisierten allergischen Reaktion des Organismus, kann das zum anaphylaktischen Schock bis hin zum Herz-Kreislaufstillstand führen (RING und MESSMER 1977). Allergiker mit Hymenopterengiftallergie sollten daher immer ein Notfallset bei sich tragen, da stets das Risiko einer unmittelbaren Allergenexposition besteht. In dem Notfallset sollten ein schnell wirksames H1 - blockierendes Antihistaminikum, ein Glukokortikoid, β 2-Sympathomimetika in Form von Aerosolen und Adrenalin in einem Autoinjektor zur intramuskulären Injektion enthalten sein (PRZYBILLA et al. 2011). Im Fall eines Stiches ist sofort der Notarzt zu rufen. Die ärztliche Behandlung wird dann nach einem Algorithmus durchgeführt, der an den Schweregrad der Symptome adaptiert ist (Abb.3). Langfristig ist eine Therapie in Form einer Hyposensibilisierung / spezifischen Immuntherapie (SIT) indiziert (RUËFF et al. 2005). (Abb.3.)

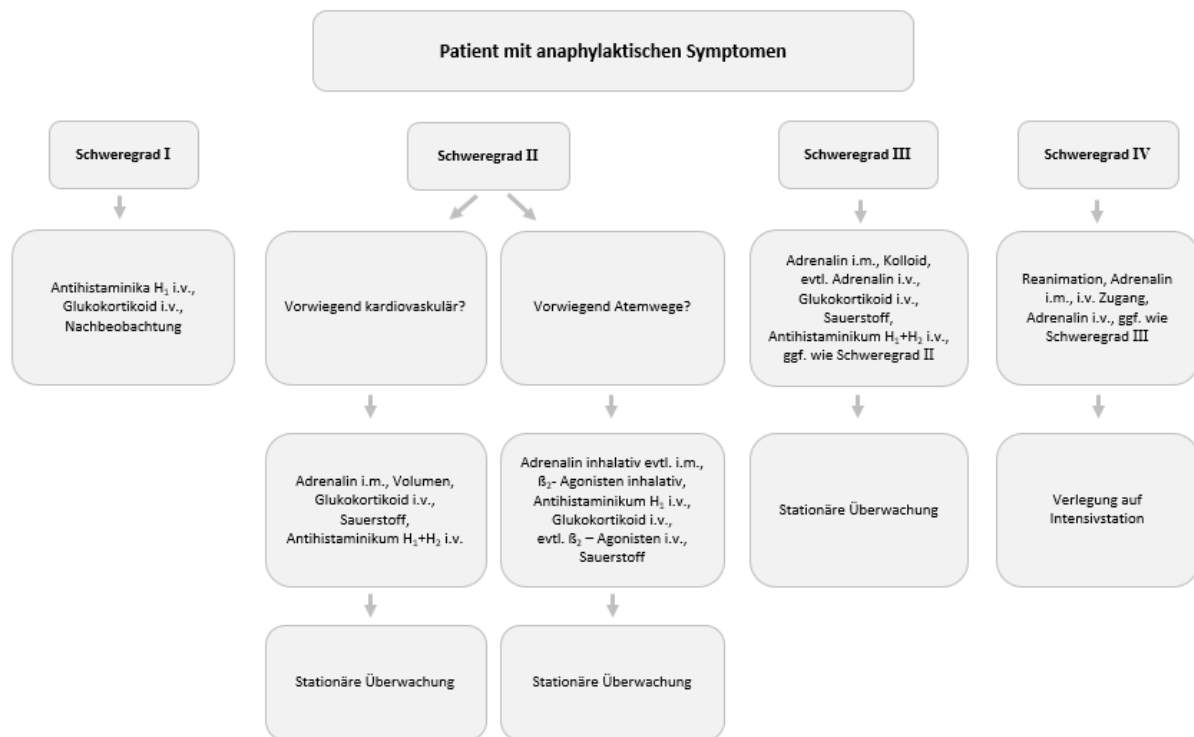


Abb. 3 : Algorithmus zur Vorgehensweise bei einer allergischen Reaktion der an den Schweregrad adaptiert ist. Quelle: PRZYBILLA et al. 2011 Leitlinien Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie, *Allergo J* 20: 318-39

2.6. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll anhand einer retrospektiven Studie eines Patientenkollektivs von insgesamt 114 Patienten das Vorkommen, die Bedeutung und die klinische Relevanz von spezifischen IgE-Antikörpern gegenüber rekombinanten Allergenen bei Hymenopterenallergie untersucht und beurteilt werden.

Die Tatsache, dass es eine hohe Homologie der Bestandteile von Bienen- und Wespengift gibt, stellt eine Herausforderung für die Differenzialdiagnostik dar, bei der zunehmend Testverfahren mit rekombinanten Allergenen eine Rolle spielen. Die allergenen Epitope im Bienen- und Wespengift sind zahlreich. Bienengift enthält u.a. das Glycoprotein Phospholipase A2 (Api m1), Mellitin (Api m4) und Hyaluronidase (Api m2). Wespengift enthält u.a. Phospholipase A1 (Ves v 1), Hyaluronidase (Ves v 2), Ves v5 (Antigen 5) und Pol d5. Beide Gifte enthalten zusätzlich identische allergene Kohlenhydratketten (CCD). Da es sich bei den rekombinanten Allergenen um isolierte giftspezifische Epitope handelt, kann es nicht aufgrund von Verunreinigungen oder CCDs zu falsch positiven Messergebnissen wie bei den Nachweisverfahren einer Allergie auf das entsprechende Gesamtgift kommen.

In dieser Arbeit werden die Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene der Biene (rApi m1), Wespe (rVes v5) und Feldwespe (rPol d5) bei Patienten mit anamnestisch und klinisch diagnostizierter Bienen- und/oder Wespengiftallergie untersucht und die Ergebnisse mittels biometrischer Analyse auf Signifikanz überprüft. Zur Beurteilung der Ergebnisse, werden sie im Zusammenhang den anderen erhobenen Daten aus dem Patientenkollektiv betrachtet, um folgende Fragen beantworten zu können:

- wie es sich mit dem Vorkommen und der Verteilung der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene rApi m1, rVes v5 und rPol d5 bei Patienten mit Hymenopterenallergie verhält
-

-
- wie die Sensitivität und Spezifität der Untersuchung dieser Antikörper zu bewerten ist.
 - ob es zwischen dem Alter oder dem Geschlecht und den spezifischen IgE-Antikörpern gegen die rekombinanten Allergenen Zusammenhänge gibt
 - ob das Ergebnis des Intrakutantests mit der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene korreliert
 - ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen Bienen- oder Wespengift und der Höhe der CAP-Klassen der entsprechenden spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene gibt
 - ob es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der CAST-Elisa Untersuchungen und den spezifischen IgE-Antikörpern gegen die rekombinanten Allergene gibt.
 - ob es bei Patienten mit Hymenopterenallergie einen Zusammenhang zwischen den CAP-Klassen bei den rekombinanten Allergenen und dem Grad der Symptome gibt
-

3. Material und Methoden

3.1. Dokumentation und Quellen

Die Daten, die der Arbeit zugrunde liegen sind den Patientenakten der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen.

3.2. Erhobene Daten

Die für die Arbeit relevanten und erhobenen Daten umfassen: das Alter, das Geschlecht, die CAP-Klassen der spezifischen IgE-Antikörper gegen Bienen- und Wespengift sowie die Konzentrationen der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene für Biene, Wespe und Feldwespe mit der Bezeichnung rApi m1 für Bienengift [kU/l], rVes v5 für Wespengift [kU/l] und rPol d5 für Feldwespengift [kU/l]. Die Einteilung in CAP Klassen ist in Abschnitt 3.4.2. dargestellt (Tab.1). Für die Laborwerte der rekombinanten Allergene sind die absoluten Werte erfasst-, sowie die Einteilung in CAP-Klassen für die jeweiligen Werte übernommen bzw. vorgenommen worden. Außerdem wurde das Ergebnis der Intrakutantests mit den entsprechenden Giften (3.4.3.), der Grad der Symptome nach RING und MESSMER 1977 und die Diagnose in die Auswertung einbezogen.

Die Auswertung umfasst alle Patienten, die im Jahr 2011 im Allergielabor der Hautklinik hinsichtlich einer Hymenopterenallergie untersucht wurden. Als „allergisch“ gelten die Patienten, bei denen nach der Anamnese und Laboruntersuchungen sowie einem Intrakutantest eine Indikation zur Hyposensibilisierung gestellt wurde. In manchen Fällen war für die Indikationsstellung noch ein CAST-ELISA Test nötig (3.4.4.). Diese Ergebnisse sind ebenfalls in die Datenerhebung eingeflossen. Das Alter der Patienten wurde zum Zeitpunkt der Untersuchung im Jahr 2011 erfasst. (Auswertungstabelle im Anhang).

3.3. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 114 Patienten, davon 54 Männer (47,37 %) und 60 Frauen (52,63%). Das Alter der Patienten lag zwischen 8 und 82 Jahren (Mittelwert 49,16 Jahre). Eingeschlossen in die Studie sind alle Patienten, die bei Verdacht auf eine Bienen- oder Wespengiftallergie im Jahr 2011 im Allergielabor der Abteilung für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsklinik des Saarlandes untersucht wurden.

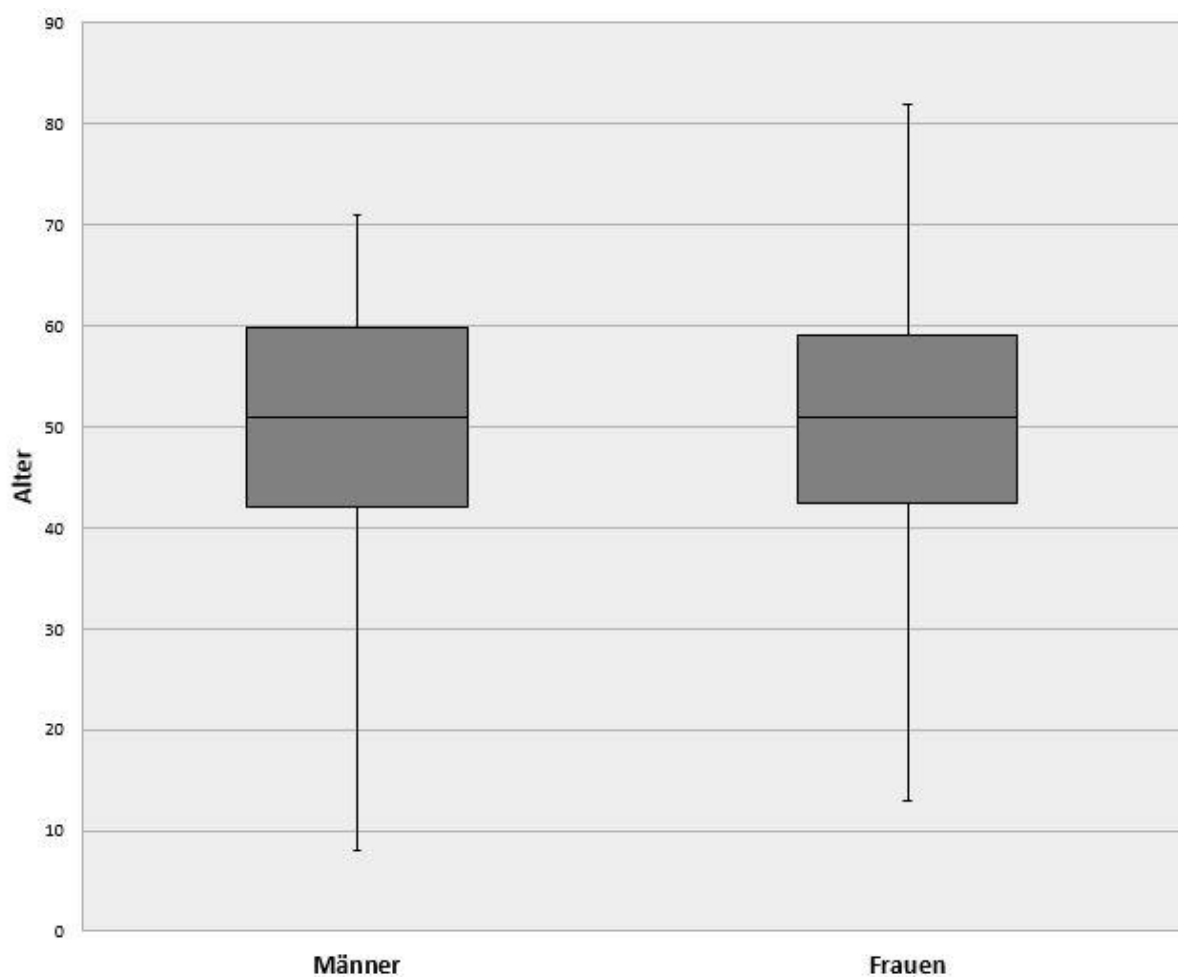


Abb.4: Box-Plot Grafik zur Darstellung der Altersverteilung für männliche und weibliche Patienten

Bei dem Patientenkollektiv gab es von den 114 Patienten 106 Patienten mit auswertbaren Diagnosen zu dem Zeitpunkt der Datenerhebung. Es waren 10 Patienten gegen Bienengift allergisch (9,43 %), 87 Patienten gegen Wespengift (82,08 %) und 3 Patienten gegen Bienen- und Wespengift (2,83 %). Sechs Patienten waren weder gegen Bienen- noch gegen Wespengift allergisch (5,66 %).

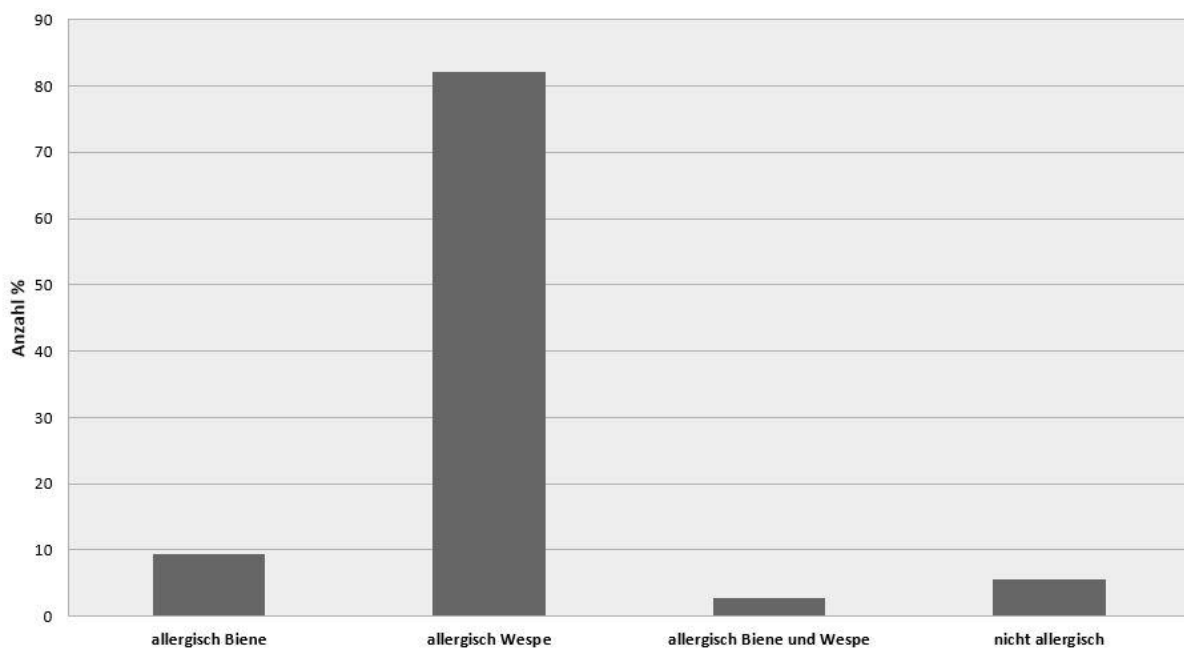


Abb.5: Balkendiagramm zur Darstellung der Häufigkeiten von Bienen- und Wespengiftallergie des Patientenkollektivs.

3.4. Diagnostik

3.4.1. Immunoassays

Die Laborparameter wurden nach der Blutentnahme mittels der Enzyme Linked Immunosorbent Assay Methode (ELISA) ermittelt, einer bioanalytischen Methode, die zu den Immunoassays gehört, und ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren der Antigene darstellt (ENGVALL und PERLMANN 1971). Der Antikörper- ELISA gehört zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA).

Die spezifischen Antikörper werden genutzt um das nachzuweisende Agens, das Antigen, zu binden. Hierbei kann es sich um Proteine, aber auch niedermolekulare Strukturen wie Viren, Toxine, Hormone oder Pestizide handeln. Das Antigen wird mit einem Reporterenzym markiert, das eine Reaktion katalysiert, sobald das Antigen an den Antikörper gebunden hat, die sich meist durch einen Farbumschlag äußert. Mit einem Photometer ist auch eine quantitative Aussage zu treffen, da die Signalstärke direkt auf die Antigenkonzentration schließen lässt, indem man mithilfe einer Serie bekannter Antigenkonzentrationen - der Standardreihe - eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal erstellt. Es handelt sich um ein etabliertes Verfahren mit einer sehr hohen Sensitivität.

Bei dem Sandwich ELISA - oder auch Antigen-ELISA - braucht man zwei Antikörper, die an das nachzuweisende Antigen binden (DUSEMUND und BARRACH 1982). Dies muss an unterschiedlichen Epitopen des Antigens geschehen, um eine gegenseitige Behinderung auszuschließen.

Der erste Antikörper, der Fangantikörper, wird an einer festen Platte gebunden. Danach wird die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen dazugegeben und eine Inkubationszeit eingehalten. Die Platte wird dann gewaschen. Es bleiben nur gebundene Antigene zurück. Danach wird ein zweiter, sogenannter Detektions-Antikörper, dazugegeben, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet und an dessen Ende ein Rezeptorenzym gebunden ist. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach erneutem Waschen der Platte wird ein chromogenes Substrat hinzugegeben, welches mit dem am Detektionsantikörper gebundenen

Rezeptorensystem reagiert und zu einem Farbumschlag führt. Auch hier wird im Vergleich mit einer Standardreihe photometrisch die Konzentration des Antigens bestimmt.

3.4.2. ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Das ImmunoCAP® System (Thermo Fisher Scientific, Phadia GmbH) ist ein hochsensitives EIA Verfahren. Es wurde speziell für IgE-Tests bzw. Allergietests entwickelt. Auf Zelluloseschwämmen (CAPACITY oder „CAP“) wird ein Allergen gebunden - beispielsweise ein isoliertes Protein oder ein rekombinantes Allergen - das mit Serum inkubiert wird. Mittels enzymmarkierter Antikörper kann der am Allergen gebundene Antikörper nachgewiesen werden.

Die Bindung von IgE-Antikörpern stellt sich als schwierig dar, da die Konzentration im Blut meist sehr gering ist und der Test empfindlich genug sein muss um Antikörper gegen die relevanten Komponenten zu erfassen und die IgE-Antikörper trotz der Konkurrenz mit anderen Antikörpern derselben Spezifität, die in höheren Konzentrationen vorliegen, zu binden. Dies ist durch eine hohe Optimierung aller Komponenten des ImmunoCAP® Systems möglich. Das ImmunoCAP® System kann verschiedene spezifische IgE-Epitopprofile erstellen und lässt Rückschlüsse auf das Molekül in dem Allergen zu, das bei dem Patienten allergieauslösend wirkt. Es kann so eine Doppelsensibilisierung von einer Kreuzsensibilisierung unterschieden werden, da Verunreinigungen ausgeschlossen sind.

Auch die quantitative Bestimmung der IgE-Antikörper im Blut ist mit diesem System möglich. Das ist von klinischer Relevanz, da die Wahrscheinlichkeit von klinischen Symptomen mit der Konzentration an IgE steigt (HAAHTELA et al. 1982). Die Messung von IgE-Antikörpern im Blut ermöglicht in erster Linie eine Aussage über die Sensibilisierung eines Allergikers. Das System ist auf das WHO Referenzpräparat 75/502 für Humanserum Immunglobulin – E kalibriert, und entspricht somit dem WHO (World Health Organisation) Standard. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 kU/l und deckt den gesamten klinisch relevanten Messbereich ab. Bei der Einteilung in

CAP- Klassen entspricht jede CAP Klasse einem Konzentrationsbereich an spezifischen IgE. (Tab.1.)

Konzentration an spezifischem IgE (kU/l)	CAP-Klasse	Beurteilung
<0,35	0	negativ
0,35 – 0,70	1	grenzwertig positiv
>0,70– 3,50	2	schwach positiv
>3,50 – 17,5	3	positiv
>17,50 – 50,0	4	stark positiv
>50,0 – 100	5	sehr stark positiv
>100	6	sehr stark positiv

Tab.1: Beurteilung von ImmunoCAP® Ergebnissen in dieser Arbeit.

Quelle: Thermo Scientific Inc. www.thermoscientific.com/phadia/de

3.4.3. Intrakutantest

Der Intrakutantest wurde mit Venomil® Bienen- bzw. Wespengift durchgeführt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt, ausgehend von der Stammlösung mit der Konzentration 100 µg/ml Wespen-/Bienengift. Die Verdünnung erfolgte in 10-Potenzschritten bis 10⁻⁶ µg/ml. Begonnen wurde mit der niedrigsten Konzentration. Es wurden 0,05 ml intrakutan in den beugeseitigen Unterarm injiziert. Zur Referenzkontrolle wurden Histamin (Positivkontrolle) und eine physiologische NaCl-Lösung (Negativkontrolle) intrakutan injiziert. Nach ca. 20 Minuten konnte das Ergebnis anhand von Hautrötungen, Quaddelgröße und Juckreiz beurteilt werden. Zeigte sich im Bereich des injizierten Giftes keine Rötung oder Quaddel in

histaminäquivalenter Größe wurde der Test mit der nächst höheren Konzentration fortgeführt.

Der Intrakutantest wurde als positiv gewertet, wenn sich bei einer Giftkonzentration eine in der Größe histaminäquivalente Quaddel zeigte, bzw. im Verlauf hinsichtlich der Quaddelgrößen eine Crescendo-Reaktion zu beobachten war.

Der Intrakutantest zeigt eine hohe Sensitivität, birgt aber das mögliche Risiko systemischer Reaktionen. Er wird deshalb vornehmlich in Kliniken durchgeführt.

Antihistaminika müssen mindestens 7 Tage - und Kortikosteroide mindestens 6 Wochen vor dem Test abgesetzt werden, da sie das Testergebnis verfälschen können bzw. eventuell falsch negative Ergebnisse verursachen würden.

3.4.4. CAST ® ELISA (Bühlmann Laboratories AG)

Der “cellular antigen stimulation test” (CAST) basiert auf Interleukin-3 aktivierten basophilen Granulozyten, die unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Allergens ausgesetzt werden. Die basophilen Granulozyten die durch das Allergen aktiviert werden, exprimieren Leukotriene, deren Konzentration mittels des ELISA Verfahrens messbar ist (SCHERER et al. 2008)

Da dieses Verfahren kostenintensiv ist, verwendet man es oft nur bei unklaren Ergebnissen nach Labor- und Intrakutantests bzw. zum Ausschluss einer Hymenopterenallergie.

Falls der CAST ® ELISA Test gemacht wird, wird zunächst der Blutprobe Dextran zur Antikoagulation zugefügt. Man lässt die Erythrozyten sedimentieren und arbeitet mit der erythrozytenfreien Phase weiter. Durch Zentrifugieren werden in einem weiteren Schritt die Thrombozyten entfernt. Die Zelllösung wird dann in eine IL-3 Lösung gegeben und dadurch basophile Granulozyten aktiviert.

Anschließend wird die Zelllösung in eine Probe mit Anti-IgE Rezeptor Antikörpern (Positivkontrolle), eine Probe ohne Antikörper (Background) und Allergenproben verschiedener Konzentrationen gegeben.

Die Beurteilung der Serumleukotrienkonzentrationen erfolgt mittels des ELISA Verfahrens.

Der Hersteller gibt an, dass Proben mit Leukotrienkonzentrationen > 200 pg/ml als positiv für das getestete Allergen betrachtet werden sollen.

Medikamente die der Patient einnimmt, sollten falls sie Antihistaminika, Kortikosteroide oder Chromoglycinsäure enthalten, 3 bis 7 Tage vor der Probennahme abgesetzt werden, damit sie kein falsch negatives Testergebnis verursachen.

3.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten und die Erstellung der Diagramme erfolgten mithilfe von SPSS Version 14.0 und Excel 2013.

Die grafischen Darstellungen wurden mit Box-Plots, Kuchendiagrammen und Balkendiagrammen umgesetzt. Zum Vergleich der verschiedenen Variablen wurden nichtparametrische Tests wie der Mann-Whitney-U-Test und Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman angewendet. Zuvor und während der Auswertung erfolgten biometrische Beratungen bei Herrn PD Dr. Gräber im Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Medizinischen Fakultät des Saarlandes.

4. Ergebnisse

4. 1. Allgemeines

Von den 114 Patienten, die im Jahr 2011 in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinik des Saarlandes mit Verdacht auf eine IgE vermittelte Wespen- bzw. Bienengiftallergie untersucht wurden, wurden 10 Bienengiftallergiker, 87 Wespengiftallergiker und 3 Patienten mit einer Allergie gegen Bienen- und Wespengift diagnostiziert. Sechs Patienten waren nicht allergisch und bei 8 Patienten lag zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine Diagnose vor. Es wurde eine Einteilung der absoluten Werte in CAP-Klassen vorgenommen. Somit liegt hier statt eines metrischen Skalenniveaus ein ordinales Skalenniveau vor. Da die Verteilungen deutliche Abweichungen von einer Normalverteilung zeigen und die Einteilung in CAP Klassen nicht auf gleich großen Intervallen basiert, erfolgten in diesen Fällen die Auswertungen mit nicht-parametrischen Verfahren.

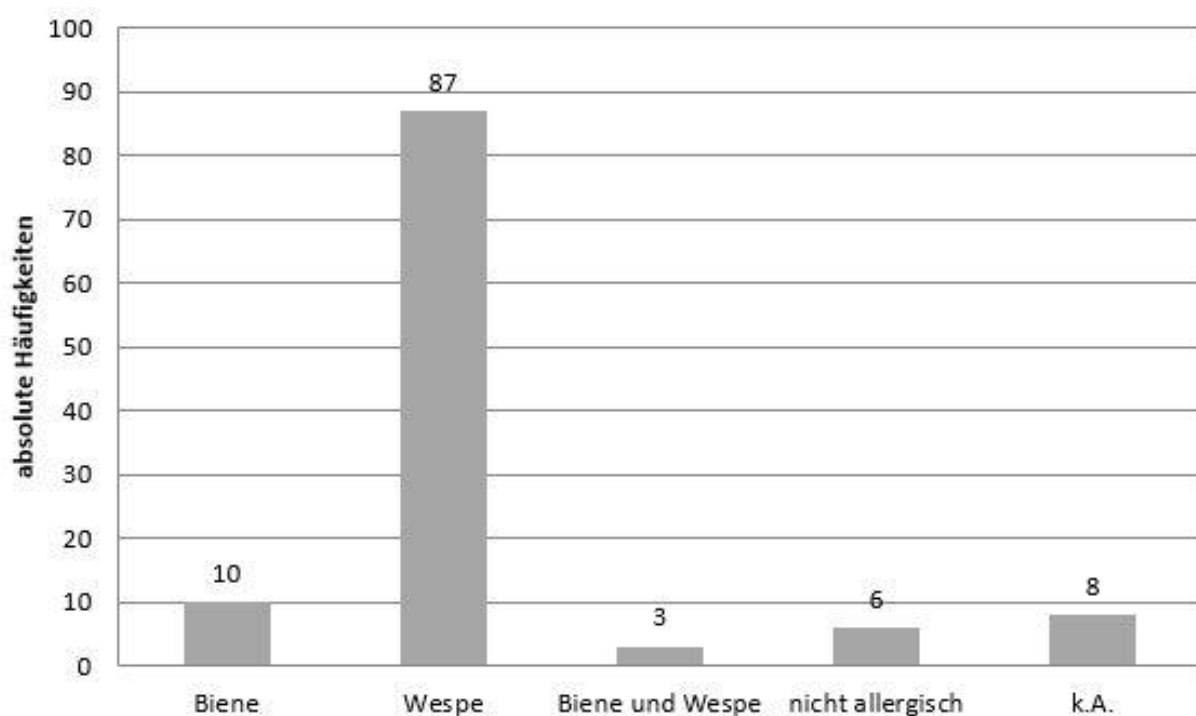


Abb.6: Balkendiagramm zur Darstellung der Diagnosen des Patientenkollektivs

4.2. Häufigkeitsverteilung von spezifischen IgE-Antikörpern gegen rekombinante Allergene bei Patienten mit Hymenopterenallergie

Bei den Patienten mit einer diagnostizierten Hymenopterenallergie wurde in dieser Arbeit zunächst die Verteilung der relevanten rekombinanten Allergene rApi m1, rVes v5 und rPol d5 untersucht.

4.2.1. Häufigkeitsverteilung bei den Bienengiftallergikern

	<u>CAPrApim1 Bienengift</u>		<u>CAPrPold5 Feldwespengift</u>		<u>CAPrVesv5 Wespengift</u>	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	1	7,7	8	61,5	7	53,8
1	1	7,7	2	15,4	-	-
2	6	46,2	3	23,1	5	38,5
3	2	15,4	-	-	1	7,7
4	3	23,1	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
Gesamt	13		13		13	
fehlend	-		-		-	

Tab.2: Tabellarische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CAP Klassen der 3 untersuchten rekombinanten Allergene innerhalb der Gruppe der Bienengiftallergiker

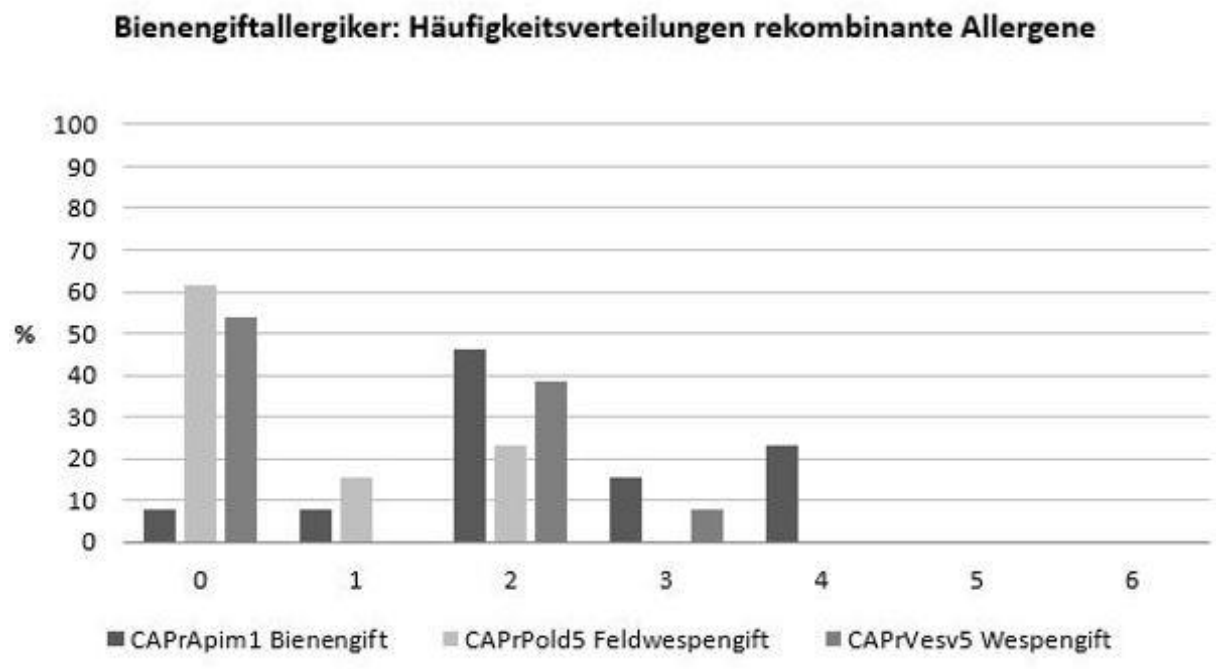


Abb.7: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CAP Klassen der 3 untersuchten rekombinanten Allergene innerhalb der Gruppe der Bienengiftallergiker

Es zeigte sich, dass Bienengiftallergiker zum Teil auch spezifische IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene rVes v5 und rPol d5 aufwiesen. Der Grund ist nicht bei den doppelt-sensibilisierten Patienten zu suchen, da es hiervon im Patientenkollektiv nur 3 gab. Bienengiftallergiker hatten zu 38,46 % spezifische IgE-Antikörper gegen rPol d5 (n=5) und zu 46,15 % (n= 6) spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5 im Blut.

4.2.2. Häufigkeitsverteilung bei den Wespengiftallergikern

	<u>CAPrApim1 Bienengift</u>		<u>CAPrPold5 Feldwespengift</u>		<u>CAPrVesv5 Wespengift</u>	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	81	92,0	28	32,6	10	11,2
1	3	3,4	12	14,0	7	7,9
2	3	3,4	27	31,4	30	33,7
3	1	1,1	14	16,3	29	32,6
4	-	-	5	5,8	8	9,0
5	-	-	-	-	4	4,5
6	-	-	-	-	1	1,1
Gesamt	88		86		89	
fehlend	2		4		1	

Tab.3: Tabellarische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CAP Klassen der 3 untersuchten rekombinanten Allergene innerhalb der Gruppe der Wespengiftallergiker

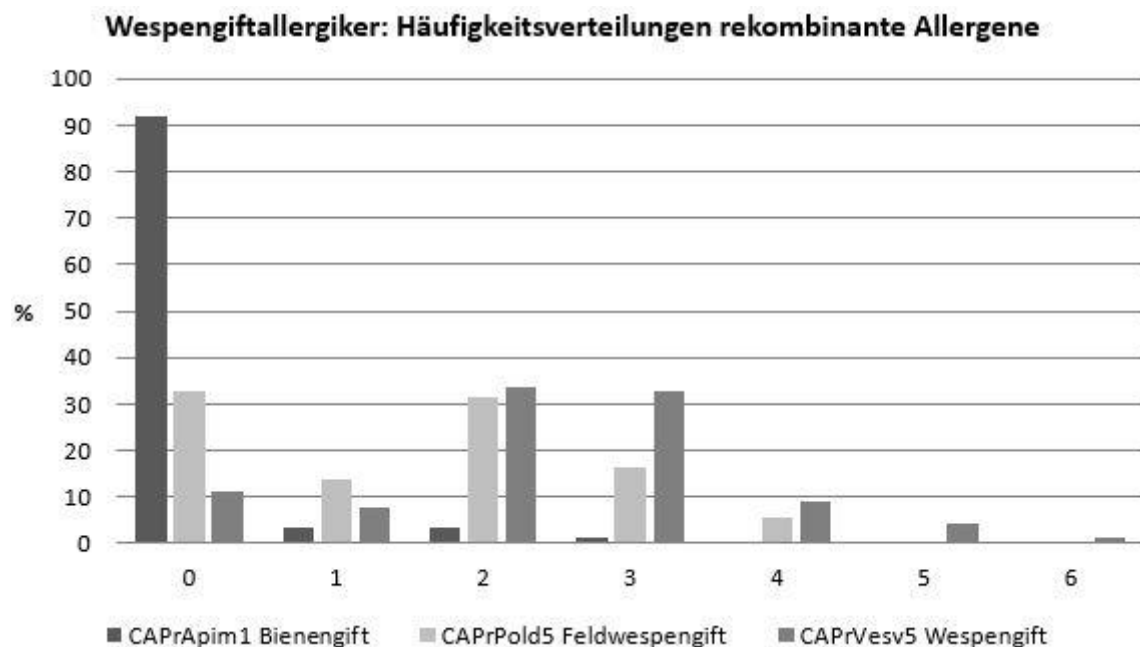


Abb.8: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der CAP Klassen der 3 untersuchten rekombinanten Allergene innerhalb der Gruppe der Wespengiftallergiker

Es zeigte sich, dass Wespengiftallergiker zum Teil auch spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rApi m1 aufwiesen. Der Grund ist auch hier nicht bei den doppelt-sensibilisierten Patienten zu suchen, da es hiervon im Patientenkollektiv nur 3 gab. 7,96 % (n=7) der Wespengiftallergiker hatten spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rApi m1 im Blut.

4.3. Sensitivität und Spezifität der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rekombinante Allergene bei den Allergikern

Hierzu wurde untersucht, wie viele Allergiker alleine mit der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen die relevanten rekombinanten Allergene richtig diagnostiziert worden wären, bzw. wie die Sensitivität und die Spezifität dieser Untersuchung war.

4.3.1. rApi m1 bei Bienengiftallergikern

Es wurde untersucht, wie viele Bienengiftallergiker spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Bienengiftallergen rApi m1 in einer Konzentration entsprechend der CAP 1 Kasse oder höher aufwiesen. Es gab im Patientenkollektiv 13 Bienengiftallergiker bei denen eine Hyposensibilisierung eingeleitet werden sollte. 12 dieser Patienten (92,31 %) wären alleine mit der Untersuchung dieses rekombinanten Allergens richtig diagnostiziert worden. Die Sensitivität betrug 92,31 %, die Spezifität lag bei 94,57%. (Abb.9)

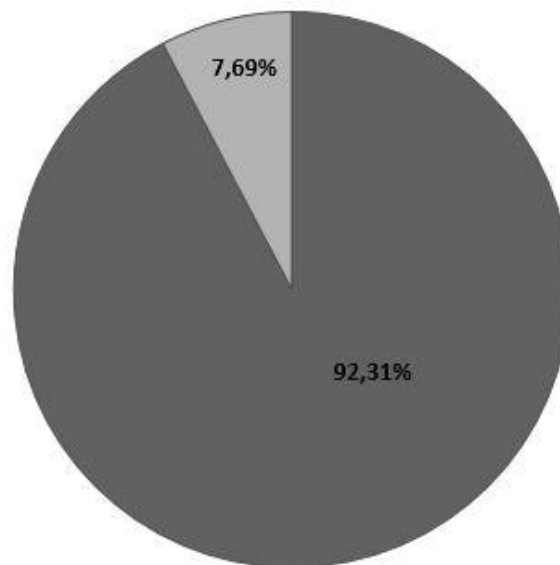
rApi m1 CAP 1 oder höher bei Bienengiftallergikern

Abb.9: Kuchendiagramm zur Darstellung der Sensitivität der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rApi m1 bei Bienengiftallergikern

4.3.2. rVes v5 bei Wespengiftallergikern

Hierbei wurde untersucht, wie viele Wespengiftallergiker spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Wespengiftallergen rVes v5 in einer Konzentration entsprechend der CAP 1 Klasse oder höher aufwiesen. Es gab im Patientenkollektiv 90 Wespengiftallergiker bei denen eine Hyposensibilisierung eingeleitet werden sollte. Bei 89 Patienten gab es gültige Daten für das rekombinante Allergen rVes v5. 79 dieser Patienten (88,76 %) wären alleine mit der Untersuchung dieses rekombinanten Allergens richtig diagnostiziert worden. Die Sensitivität betrug 88,76 %, die Spezifität lag bei 66,67 %. (Abb.10)

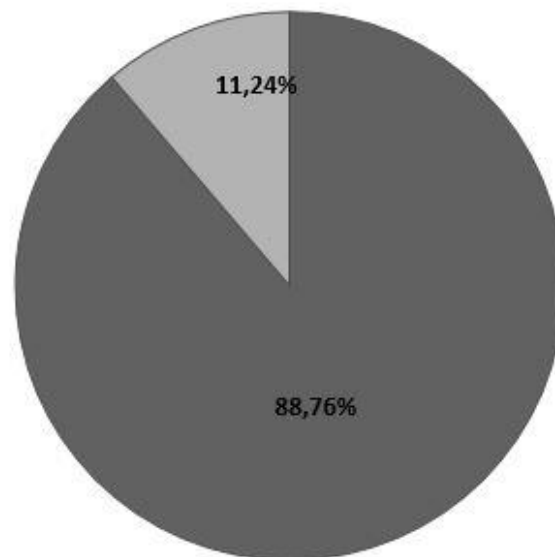
rVes v5 CAP 1 oder höher bei Wespengiftallergikern

Abb.10: Kuchendiagramm zur Darstellung der Sensitivität der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5 bei Wespengiftallergikern

4.3.3. rPol d5 bei Wespengiftallergikern

Außerdem wurde bei den Wespengiftallergikern erfasst, wie viele Patienten spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rPol d5 in einer Konzentration entsprechend der CAP Klasse 1 oder höher aufwiesen. Von den 90 Wespengiftallergikern gab es bei 86 Patienten hierzu gültige Daten. 67,44% der Patienten wären alleine mit der Untersuchung auf das rekombinante Allergen rPol d5 richtig diagnostiziert worden. Die Sensitivität betrug 67,44%, die Spezifität lag bei 73,33 %. (Abb.11)

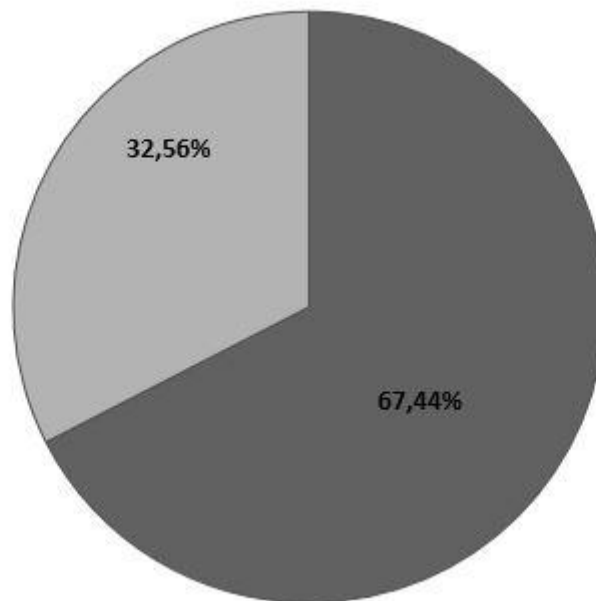
rPol d5 CAP 1 oder höher bei Wespengiftallergikern

Abb.11: Kuchendiagramm zur Darstellung der Sensitivität der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rPol d5 bei Wespengiftallergikern

4.3.4. rVes v5 und rPol d5 bei Wespengiftallergikern

Die Kombination der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5 und rPol d5 zusammen verbesserte die Sensitivität nicht gegenüber der alleinigen Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5. Sie betrug 88,76 % und entsprach damit der Sensitivität der Untersuchung des rekombinanten Allergens rVes v5. (Abb.12)

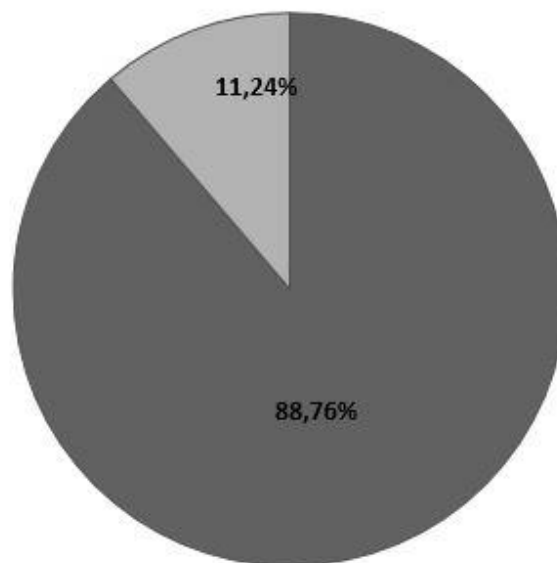
rVes v5 und rPol d5 CAP 1 oder höher bei Wespengiftallergikern

Abb.12: Kuchendiagramm zur Darstellung der Sensitivität der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5 und rPol d5 bei Wespengiftallergikern

4.4 Häufigkeitsverteilung der absoluten Werte der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene bei Allergikern mit CAP Klasse 0

Um die Frage nach dem Vorkommen der spezifischen IgE Antikörper gegen die rekombinanten Allergenen genauer beantworten zu können und nicht nur die Häufigkeiten und Sensitivität und Spezifität zu betrachten, wurden die absoluten Werte der CAP Klassen 0 genauer untersucht. Die CAP Klasse 0 entspricht einer spezifischen IgE- Antikörpermengung von $< 0,35$ kU/l gegen das entsprechende rekombinante Allergen. Patienten mit einer CAP Klasse 0 gelten als nicht allergisch. Es wurde in der Vergangenheit bereits der Grenzwert von $\geq 0,35$ kU/l für ein positives Testergebnis beim Allergietest kritisiert und für zu hoch gehalten. Man sah hier einen Grund für die bis dato schlechten Ergebnisse bei der Sensitivität. Es wurde deshalb im Folgenden auch untersucht, ob sich die Sensitivitäts- und Spezifitätsergebnisse verbessern, wenn man den Grenzwert von 0,35 kU/l auf 0,1 kU/l herabsetzt, wie es bereits von GUERTI K et al. 2008 vorgeschlagen wurde.

4.4.1 Bienengiftallergiker mit CAP Klasse 0 für rApi m1

Es gab in der Gruppe der Bienengiftallergiker einen Patienten (7,69 %), der der CAP Klasse 0 zugeordnet wurde. Die Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen rApim1 betrug für diesen Patient 0,01 kU/l. Die Sensitivität bei einem Grenzwert von 0,1 kU/l blieb unverändert bei 92,31 % bei einer schlechteren Spezifität von 85,39%.

4.4.2 Wespengiftallergiker mit CAP Klasse 0 für rVes v5

Es gab 9 Wespengiftallergiker und einen Patienten, der sowohl gegen Wespen- als auch gegen Bienengift allergisch war, deren CAP Klasse 0 für rVes v5 betrug. Tab.5 zeigt die Verteilung der Ves v5 Werte dieser Patienten.

rVesv5 (kU/l) Wespengift

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig ,00	1	10,0	10,0	10,0
,01	2	20,0	20,0	30,0
,04	1	10,0	10,0	40,0
,09	1	10,0	10,0	50,0
,10	1	10,0	10,0	60,0
,17	1	10,0	10,0	70,0
,19	1	10,0	10,0	80,0
,23	1	10,0	10,0	90,0
,31	1	10,0	10,0	100,0
Gesamt	10	100,0	100,0	

Tab.4: Verteilung der spezifischen IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rVes v5 dieser Patienten

Statistik

rVesv5 (kU/l) Wespengift

N	Gültig	10
	Fehlend	0
Mittelwert		,1150
Standardabweichung		,10628
Minimum		,00
Maximum		,31

Tab.5: Statistische Auswertung der Verteilung in Tab.4

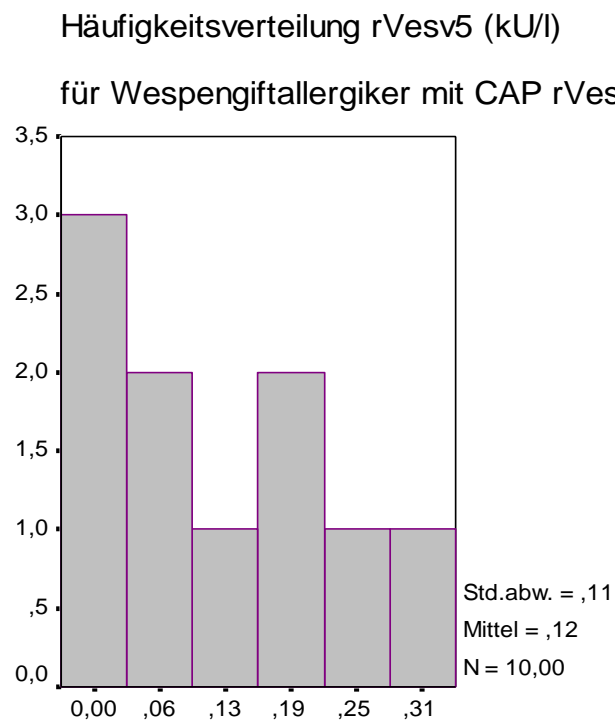


Abb.13: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung von Tab.4

Bei den Wespengiftallergikern mit einer CAP Klasse von 0 bei dem rekombinanten Allergen rVes v5 gab es 5 Patienten (50 %) mit spezifischen IgE-Antikörpern unter einem Schwellenwert von 0,1 kU/l. Ein Patient (10 %) hatte einen Wert von 0,00 kU/l für rVes v5. Die Sensitivität verbesserte sich bei einem Grenzwert von 0,1 kU/l leicht auf 92,86 %, wobei die Spezifität mit nur noch 31,58 % erheblich schlechter wurde.

4.4.3 Wespengiftallergiker mit CAP Klasse 0 für rPol d5

Es gab 27 Wespengiftallergiker und einen Patienten, der sowohl gegen Wespen- als auch gegen Bienengift allergisch war, deren CAP Klasse für rPol d5 0 betrug.

Tab.7 zeigt die Verteilung der rPold5 Werte für diese Personen, wobei für n=2 Patienten keine Angaben vorliegen.

rPold5 (kU/l) Feldwespengift

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig ,00	2	7,1	7,7	7,7
,01	3	10,7	11,5	19,2
,02	1	3,6	3,8	23,1
,03	1	3,6	3,8	26,9
,04	1	3,6	3,8	30,8
,05	1	3,6	3,8	34,6
,06	2	7,1	7,7	42,3
,07	2	7,1	7,7	50,0
,08	1	3,6	3,8	53,8
,09	1	3,6	3,8	57,7
,13	1	3,6	3,8	61,5
,14	1	3,6	3,8	65,4
,16	1	3,6	3,8	69,2
,17	3	10,7	11,5	80,8
,18	1	3,6	3,8	84,6
,21	1	3,6	3,8	88,5
,27	1	3,6	3,8	92,3
,29	1	3,6	3,8	96,2
,32	1	3,6	3,8	100,0
Gesamt	26	92,9	100,0	
Fehlend 1000,00	2	7,1		
Gesamt	28	100,0		

**Tab.6: Verteilung der spezifischen IgE-Antikörper gegen das rekombinante
Allergen rPol d5 dieser Patienten**

Statistik**rPold5 (kU/l) Feldwespengift**

N	Gültig	26
	Fehlend	2
Mittelwert		,1081
Standardabweichung		,09342
Minimum		,00
Maximum		,32

Tab.7: Statistische Auswertung der Verteilung in Tab.6

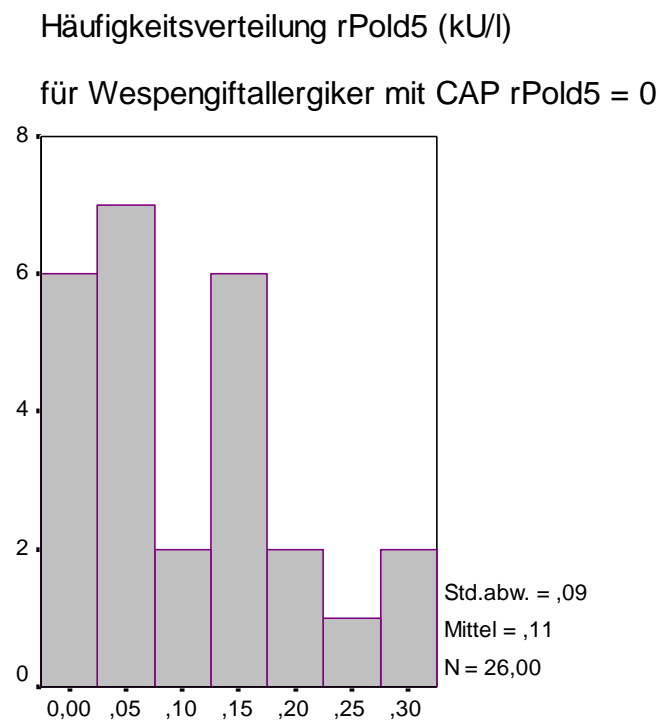


Abb.14: Grafische Darstellung der statistischen Auswertung von Tab.6

Bei den Wespengiftallergikern mit einer CAP Klasse 0 für rPol d5 gab es 15 Patienten (53,6 %) mit spezifischen IgE-Antikörpern unter einem Schwellenwert von 0,1 kU/l, wobei 2 Patienten (7,1 %) einen Wert von 0,00 kU/l aufwiesen. Die Sensitivität bei einem Grenzwert von 0,1 kU/l verbesserte sich auf 81,92 %, wobei sich die Spezifität im etwa gleichen Verhältnis auf 63,16 % verschlechterte.

4.5. Statistische Kennwerte zu Alter und Geschlecht der Allergiker

51% der Personen (n=51) waren männlich, 49% der Personen (n=49) waren weiblich. Der jüngste Patient war 8 Jahre alt, der Älteste 82. Der Mittelwert lag bei 49,16 Jahren.

4.6. Zusammenhang zwischen Alter bzw. Geschlecht und den rekombinanten Allergenen bei den Allergikern

4.6.1 Zusammenhang mit dem Geschlecht

Ob sich für die Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene ein Zusammenhang mit dem Geschlecht ergibt, wurde mittels Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Als Signifikanzniveau wurde der Wert $p=0.05$ festgelegt. Für keines der drei rekombinanten Allergene gab es einen signifikanten Zusammenhang mit dem Geschlecht. Für CAP rPol d5 gab es eine Tendenz ($p=0.089$) der folgenden Art und Weise: Während 46,8% der Frauen der CAP Klasse 0 zugeordnet wurden, waren es bei den Männern etwa 20% weniger mit 26,5%. In die CAP-Klasse 1 und höher wurden allerdings 73,5% der Männer eingestuft, wohingegen dies bei den Frauen nur 53,2% waren. (Tab.8)

%	<u>CAPrApim1 Bienengift</u>		<u>CAPrPold5 Feldwespengift</u>		<u>CAPrVesv5 Wespengift</u>	
	M	W	M	W	M	w
0	82,0	85,4	26,5	46,8	18,0	14,3
1	2,0	4,2	16,3	10,6	2,0	12,2
2	10,0	4,2	34,7	25,5	36,0	30,6
3	6,0	-	16,3	12,8	30,0	30,6
4	-	6,3	6,1	4,3	8,0	8,2
5	-	-	-	-	6,0	2,0
6	-	-	-	-	-	2,0
Gesamt	N=50	N=48	N=49	N=47	N=50	N=49
z-Wert	-.41		-1,70		-.29	
p (zweiseitig, exakt)	.719		.089		.771	

Tab.8: Tabelle zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen den Werten der CAP Klassen der rekombinanten Allergene und dem Geschlecht der Patienten

4.6.2 Zusammenhang mit dem Alter

Zur Überprüfung des Zusammenhangs der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene mit dem Alter wurden die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. In keinem Fall ergab sich eine signifikant von Null verschiedene Korrelation. Der p-Wert lag überall über 0.05.

CAPrApim1 Bienengift: $r_{sp} = -.11$ ($p=.267$), $N=98$

CAPrPold5 Feldwespengift: $r_{sp} = -.06$ ($p=.547$), $N=96$

CAPrVesv5 Wespengift: $r_{sp} = .00$ ($p=.989$), $N=99$

4.7. Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Intrakutantests und der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene bei den Allergikern

Für 85 Patienten (85,0%) lag ein positives Ergebnis des Intrakutantests vor. 14 Personen hatten ein negatives Ergebnis (14,0%) und für einen Patienten (1,0%) gab es keine Angaben hierzu. Es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für keine der drei rekombinanten Allergene ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene mit dem Ergebnis des Intrakutantest ermitteln. Für CAP rPol d5 war der Mann-Whitney-Test allerdings nur knapp nicht signifikant ($p=0.059$). Tendenziell wiesen hier Patienten mit negativem IC-Ergebnis häufiger ein negatives Ergebnis hinsichtlich des rekombinanten Allergens auf, als Patienten mit positivem IC Ergebnis – rPol d5: 61,5% (negativ) gegenüber 32,9% (positiv). Umgekehrt galt: Ein positives bis stark positives Laborergebnis bei dem rekombinanten Allergen, entsprechend der CAP Klassen 3 und 4, zeigte sich tendenziell häufiger für Patienten, für die der IC-Test positiv ausfiel (22,0% gegenüber 7,7%). (Tab.9)

%	<u>CAPrApim1 Bienengift</u>		<u>CAPrPold5 Feldwespengift</u>		<u>CAPrVesv5 Wespengift</u>	
IC-Test	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
0	84,3	78,6	32,9	61,5	14,3	28,6
1	3,6	-	14,6	7,7	6,0	14,3
2	7,2	7,1	30,5	23,1	35,7	21,4
3	1,2	14,3	15,9	7,7	28,6	35,7
4	3,6	-	6,1	-	9,5	-
5	-	-	-	-	4,8	-
6	-	-	-	-	1,2	-
Gesamt	N=83	N=14	N=82	N=14	N=84	N=14
z-Wert	-0.62		-1.89		-1.52	
p (zweiseitig, exakt)	.512		.059		.131	

Tab.9: Tabelle und Auswertung zur Darstellung des Zusammenhangs der Intrakutantests und den CAP Klassen der rekombinanten Allergene

4.8. Zusammenhang zwischen spezifischen IgE-Antikörpern gegen das Gesamtgift und spezifischen IgE-Antikörpern gegen die rekombinanten Allergene bei den Allergikern

Hierzu wurden die Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten berechnet (Tab.10).

		<u>CAPrApim1</u> <u>Bienengift</u>	<u>CAPrPold5</u> <u>Feldwespengift</u>	<u>CAPrVesv5</u> <u>Wespengift</u>
CAPspez. IgE Bienengift	r_{sp}	.69	.07	-.12
	p	<.001	.482	.250
	N	98	96	99
CAPspez. IgE Wespengift	r_{sp}	-.04	.39	.42
	p	.713	<.001	<.001
	N	98	96	99

Tab.10: Auswertung des Zusammenhangs zwischen den CAP Klassen der spezifischen IgE-Antikörper gegen Bienen- und Wespengift und den CAP Klassen der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene

Für das Bienengift ergab sich ein signifikant positiver Zusammenhang: Je höher die Werte für die spezifischen IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen waren, desto höher war der spezifische IgE-Wert für das Gesamtgift und umgekehrt.

Im Hinblick auf den spezifischen IgE-Wert des Wespengiftes galt ähnliches: Je höher der spezifische IgE-Wert gegen das Gesamtgift war, desto höhere Werte waren für die spezifischen IgE-Antikörper gegen die untersuchten rekombinanten Allergene des Wespengiftes zu erwarten.

4.9. Zusammenhang zwischen Ergebnis CAST-ELISA und den spezifischen IgE- Antikörpern gegen die rekombinanten Allergene bei den Allergikern

Für die überwiegende Mehrheit der Patienten (80,0%, n=80) lag kein Test-Ergebnis für den CAST-ELISA-Test vor. 17 Patienten (17,0%) hatten ein positives Test-Ergebnis, 3 Patienten (3,0%) ein negatives.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene und dem Ergebnis des CAST-ELISA-Tests basiert folglich nur auf der reduzierten Stichprobe von 20 Patienten. Bei rPol d5 errechnete sich ein signifikanter Zusammenhang, wobei nicht davon auszugehen ist, dass die Ergebnisse der Mann-Whitney-Tests besonders aussagekräftig sind, weil sich in der Gruppe mit negativem Ergebnis nur 3 Patienten befanden und die Stichprobe sehr klein war. (Tab.11)

%	<u>CAPrApim1 Bienengift</u>		<u>CAPrPold5 Feldwespengift</u>		<u>CAPrVesv5 Wespengift</u>	
CAST-Elisa	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
0	93,8	66,7	62,5	-	29,4	-
1	-	-	6,3	33,3	5,9	-
2	-	-	18,8	33,3	35,3	33,3
3	6,3	-	12,5	-	23,5	-
4	-	33,3	-	33,3	-	66,7
5	-	-	-	-	5,9	-
6	-	-	-	-	-	-
Gesamt	N=16	N=3	N=16	N=3	N=17	N=3
z-Wert	-1.49		-1.83		-1.70	
p (zweiseitig, exakt)	.158		.046		.125	

Tab.11: Tabelle und Auswertung zum Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der CAST-ELISA Tests und der Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene

4.10. Zusammenhang der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene und dem Grad der Symptome bei den Allergikern

In der folgenden Grafik ist abzulesen, wie die Verteilung der Schweregrade an klinischen Symptomen nach RING und MESSMER 1977 bei den Allergikern war. Die Mehrheit der Patienten litt an Symptomen entsprechen Grad 2 (50 %). 27 % der Patienten hatten Symptome entsprechend Grad 3 und 20% entsprechend Grad 1. Nur 3 % der Allergiker entsprachen klinisch Grad 0. (Tab.15)

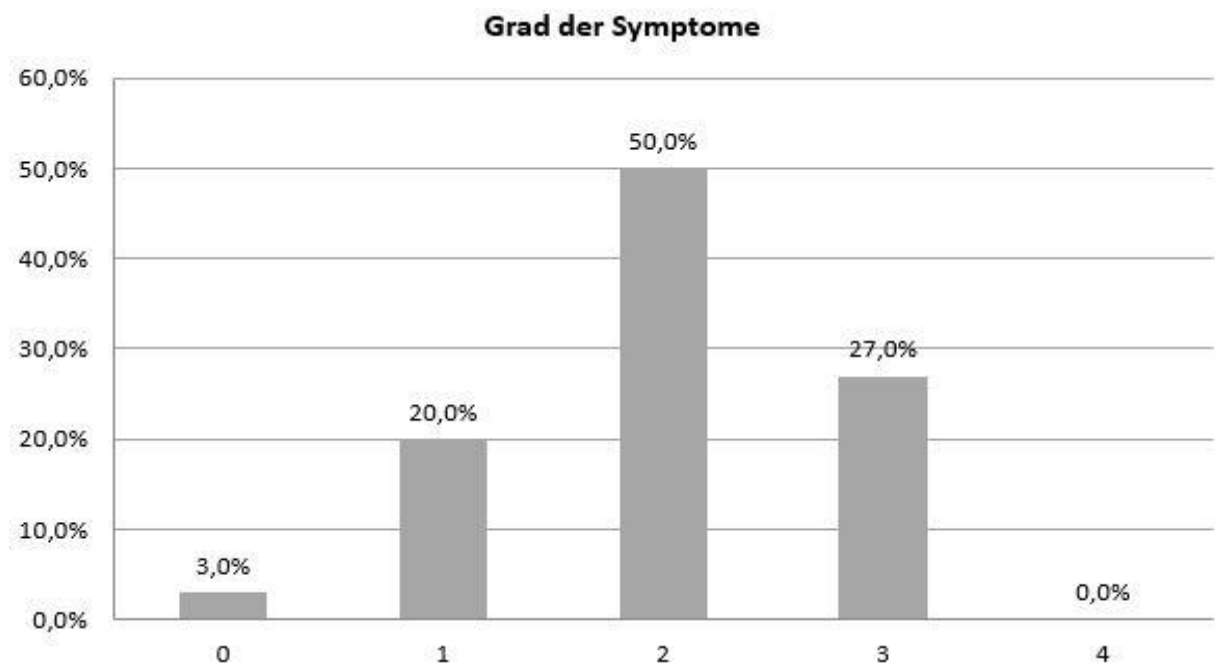


Abb.15: Prozentuelle Darstellung der Grade der Symptome nach RING und MESSMER 1977 der Allergiker

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene mit dem Grad der Symptome wurden die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. In keinem Fall ergab sich eine signifikant von Null verschiedene Korrelation:

CAPrApim1 Bienengift: $r_{sp} = -.12$ ($p=.240$), $n=98$

CAPrPold5 Feldwespengift: $r_{sp} = -.01$ ($p=.905$), $n=96$

CAPrVesv5 Wespengift: $r_{sp} = .08$ ($p=.451$), $n=99$

5. Diskussion

Rekombinante Allergene werden heute in der Allergiediagnostik als Referenz-Substanzen von Allergenen betrachtet (VAN REE R et al. 2008). Allergene als Ganzes sind meistens Proteine in Verbindung mit Kohlenhydratketten, bei denen nur bestimmte Bestandteile allergieauslösend wirken. Man unterteilt hier Major- und Minorallergene. In der Forschung werden z.Z. Allergene analysiert und Datenbanken relevanter rekombinanter Allergene angelegt. Die synthetische Herstellung ist mittlerweile bei vielen Allergenen möglich und die entsprechenden rekombinanten Allergene sind zunehmend kommerziell verfügbar. In Zukunft hofft man genauere Allergieprofile der Patienten erstellen zu können und auch in der spezifischen Immuntherapie (SIT) gezielt gegen die relevanten Allergenbestandteile hyposensibilisieren zu können. Zur Zeit beruht die Diagnostik nach wie vor auf der Immunreaktion gegen das Gesamtallergen mit all seinen Bestandteilen. Hierzu werden in der Labordiagnostik die spezifischen IgE-Antikörper gegen das Gesamtallergen in Ihrer Konzentration erfasst und in der Regel ein Intrakutantest durchgeführt, bei dem in einer Verdünnungsreihe das Gesamtallergen intrakutan injiziert wird. Da hier die allergische Reaktion unter ärztlicher Aufsicht gezielt noch einmal hervorgerufen wird, kann es zu erheblichen, unter anderem auch systemischen Nebenwirkungen, kommen. Könnte man alleine durch die Laboruntersuchungen sicher Allergien diagnostizieren, müsste man Patienten nicht mehr diesem Risiko aussetzen. Im Fall von Hymenopterengiften sind sich die Allergene in Ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich und enthalten neben Peptidsequenzen auch Kohlenhydratketten, die allergen wirken. Das stellt ein Problem bei der Unterscheidung einer echten Doppelsensibilisierung gegen Bienen- und Wespengift von einer Kreuzallergie dar. Die rekombinanten Allergene sind hier eine wesentliche diagnostische Hilfe, da sie frei von Verunreinigungen und allergenspezifisch sind.

Beim Bienengift wurden bereits von MÜLLER et al. 2009 rApi m1 und bei der Wespe rVes v5 als Majorallergen identifiziert. In dieser Arbeit wurden die spezifischen IgE-Antikörper gegen diese Majorallergene auf Bedeutung, Vorkommen und ihre klinische Relevanz bei Patienten mit Hymenopterenallergie untersucht. Hierzu wurden die Daten eines entsprechenden Patientenkollektivs aus dem Jahr 2011

herangezogen und retrospektiv untersucht. Zusätzlich zu den rekombinanten Allergenen rApi m1 und rVes v5 wurden auch die Daten zu dem rekombinanten Allergen rPol d5 der Feldwespe ausgewertet.

Bisherige Studien zeigen bei rVes v5 zwar überwiegend eine hohe Sensitivität mit 84.5% diagnostizierten Wespengiftallergikern (KOROŠEC et al. 2012), bei dem Majorallergen rApi m1 aber nur unbefriedigende Ergebnisse mit 57% diagnostizierten Bienengiftallergikern (KOROŠEC et al. 2011).

In dieser Arbeit konnte bei dem Patientenkollektiv von 114 im Allergielabor der Universitätshautklinik Homburg vorstelligen Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung bei 106 Patienten (92,98%) die Diagnose einer Hymenopterenallergie gestellt werden. Für die Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rVes v5 ergab sich mit einer Sensitivität von 88,76 % ein guter Wert, der den Ergebnissen entspricht, die in anderen Studien erzielt wurden. Für die Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rApi m1 wurde mit einer Sensitivität von 92,31 % allerdings ein wesentlich besseres Ergebnis als in anderen Studien erzielt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es von den 106 Patienten nur 13 diagnostizierte Bienengiftallergiker gab.

In einer Studie von KÖHLER et al. 2014 wurden bei Bienengift neben rApi m1 auch rApi m 3, 5 und 10 als Majorallergene betrachtet. Zusätzlich wurden weitere Minorallergene zur Diagnostik hinzugezogen. Eine Kombination von rApi m 1,2,3,5 und 10 sowie nApi m 4 konnte in dieser Studie 94.4 % der Bienengiftallergiker diagnostizieren. Bei Wespengift sollten ebenfalls weitere rekombinante Allergene zum rVes v5 für die Diagnostik herangezogen werden. (KOROŠEC et al 2012)

In dieser Arbeit wurde das rekombinante Allergen rPol d5 der Feldwespe zur Untersuchung mit herangezogen. Mit einer Sensitivität von 67,44 % in den Laborergebnissen bei Wespengiftallergikern, hatte dieses rekombinante Allergen weit weniger diagnostische Aussagekraft als rVes v5. Auch in Kombination, also der Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5 sowie rPol d5, wurde keine höhere Sensitivität als bei der alleinigen Untersuchung auf spezifische IgE-Antikörper gegen rVes v5 erzielt.

Bei der Untersuchung, ob das Geschlecht in irgendeiner Weise in Zusammenhang mit den CAP-Klassen der rekombinanten Allergene steht, zeigte sich, dass die Männer im Patientenkollektiv höhere spezifische IgE-Antikörperwerte gegen das rekombinante Allergen des Feldwespengiftes (rPol d5) hatten als die Frauen. Dies war zwar nicht statistisch signifikant, zeichnete sich jedoch als Tendenz ab. Bei den anderen rekombinanten Allergenen gab es keine signifikanten Unterschiede. YAVUZ et al. haben 2013 festgestellt, dass in der Mehrzahl bisheriger Insektengiftstudien bei Kindern, Jungen häufiger von Hymenopteren gestochen wurden als Mädchen. Dies könne mit dem unterschiedlichen Spielverhalten in diesem Alter zusammenhängen. Es könnte also sein, dass der Unterschied der Geschlechter bezogen auf rPol d5 auf eine höhere Sensibilisierung der Männer auf das Feldwespengift zurückzuführen ist.

Interessant ist auch, dass es keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den CAP Klassen bei den rekombinanten Allergenen und dem Grad der Symptome gab. Eine höhere Konzentration an spezifischen IgE-Antikörpern gegen das rekombinante Allergen bedeutet also nicht, dass der Patient stärkere Symptome nach RING und MESSMER 1977 zeigt. Bereits 2008 zeigten GUERTI et al., dass die Konzentration der spezifischen Antikörper gegen das Gesamtgift nicht zwingend mit dem Grad der klinischen Symptome korreliert. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es sich hier bezogen auf die rekombinanten Allergene ähnlich verhält. GUERTI et al. zeigten, dass auch Allergiker mit geringen Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen das entsprechende Insektengift schwere allergische Reaktionen haben können. Gleiches dürfte auch für die rekombinanten Allergene gelten, weil es in den Ergebnissen dieser Arbeit einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen Bienen- bzw. Wespengift und der Höhe der entsprechenden spezifischen IgE-Antikörper gegen die jeweiligen rekombinanten Allergene gab.

Dazu passt, dass das Alter nicht mit der Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene korrelierte, ein höheres Lebensalter (> 40) allerdings einen Risikofaktor für schwere systemische Reaktionen nach Hymenopterenstichen darstellt (RUËFF et al. 2009). Es besteht folglich ein Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Grad der Symptome, nicht aber zwischen den CAP Klassen der rekombinanten Allergene und dem Grad der Symptome. Verantwortlich für den Grad der Symptome sind nicht die

Konzentrationen der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene, sondern vor allem die Serumtryptasewerte und zusätzlich kardiovaskuläre Grunderkrankungen, die im Alter zunehmend eine Rolle spielen. Auch Betablocker und ACE-Hemmer, die in diesem Zusammenhang häufig genommen werden, gelten als Risikofaktor für schwere anaphylaktische Reaktionen (Ruëff et al. 2009).

Der Vorschlag von KÖHLER et al. 2014 mehr rekombinante Allergene in Kombination als diagnostisches Mittel heranzuziehen ist sinnvoll, um weitere Fortschritte zu erzielen, weil sich gezeigt hat, dass selbst bei Kombinationen von sechs und mehr rekombinanten Allergenen, wie im Falle des Bienengiftes, die Ergebnisse immer noch nicht an die diagnostische Sensitivität der etablierten Methoden heranreichen. Das wird auch in dieser Arbeit bei der Analyse des Vorkommens der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene bei den Bienen- und Wespengiftallergikern deutlich.

In der Vergangenheit wurde bereits die Grenze von 0,35 kU/l für ein positives Testergebnis für die schlechten Ergebnisse bei der Sensitivität der CRD verantwortlich gemacht und für zu hoch gehalten (GUERTI K et al. 2008). Sie schlugen 0,1 kU/l als Grenze vor. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Grenzwert von 0,35 kU/l die Sensitivität zwar verbessert, die Spezifität sich allerdings dabei teils deutlich verschlechtert. Der Grund für die noch unbefriedigenden Ergebnisse in der CRD ist also nicht in der Genauigkeit der Testverfahren bzw. deren Auswertung zu suchen.

Es zeigte sich außerdem, dass bei den Bienengiftallergikern auch spezifische IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene rPol d5 in 38,46 % (n=5) und rVes v5 in 46,15 % (n=6) der Fälle vorkamen. Zu bedenken ist hier allerdings die niedrige Fallzahl von 13 Patienten. Bei den Wespengiftallergikern kamen spezifische IgE-Antikörper gegen das rekombinante Allergen rApi m1 in 7,96 % der Fälle vor. Folglich ist eine eindeutige Diagnosestellung mittels dieser drei rekombinanten Allergene teils immer noch nicht möglich.

Es lässt sich auch nicht sicher eine Allergie ausschließen, wenn die entsprechenden spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene bei den Bienen- bzw. Wespengiftallergikern nicht vorliegen. Die Analyse der absoluten Werte innerhalb der CAP Klassen 0 zeigte einen Bienengiftallergiker (7,69 %) mit einer

spezifischen IgE-Antikörperkonzentration von lediglich 0,01 kU/l für rApi m1. Bei den Wespengiftallergikern mit einer CAP Klasse 0 für rPol d5 gab es 15 Patienten (53,6 %) unter einem Schwellenwert von 0,1 kU/l, wobei 2 Patienten (7,1 %) einen Wert von 0,00 kU/l aufwiesen. Bei den Wespengiftallergikern mit einer CAP Klasse 0 bei dem rekombinanten Allergen rVes v5 lagen 5 Patienten (50 %) unter einem Schwellenwert von 0,1 kU/l. Ein Patient (10 %) hatte einen Wert von 0,00 kU/l für rVes v5. Auch wenn man den Grenzwert für ein positives Ergebnis beim Allergietest mit 0,1 kU/l niedriger ansetzen würde, womit man die Nachweisgrenze des ImmunoCAP® Systems erreicht hätte, wäre es nicht möglich mittels der rekombinanten Allergene rApi m1, rVes v5 und rPol d5 alle entsprechenden Allergiker richtig zu diagnostizieren. Der Wert, den die rekombinanten Allergene für die klinische Diagnostik haben, liegt demnach momentan noch in der Differenzialdiagnostik, um Kreuzallergien auszuschließen und echte Doppelsensibilisierungen zu erkennen. Als alleiniges diagnostisches Mittel zur Erkennung einer Allergie sind sie noch nicht geeignet und man wird wohl auch in naher Zukunft nicht auf die etablierten Methoden wie die Laboruntersuchungen auf spezifische IgE-Antikörper gegen die Gesamtallergene und Intrakutantests verzichten können. Bei der Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der Konzentration an spezifischen IgE-Antikörpern gegen die entsprechenden rekombinanten Allergene und den Ergebnissen der Intrakutantests, ergab sich in dieser Studie allerdings lediglich eine Tendenz für das rekombinante Allergen rPol d5 ($p=0.059$). Die Ursache hierfür könnte an einer zu kleinen Fallzahl liegen, denn es liegt nahe, dass es einen Zusammenhang gibt, weil die Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen die rekombinanten Allergene mit der Höhe der spezifischen IgE-Antikörper gegen das entsprechende Gesamtgift korreliert und diese wiederum mit den Ergebnissen der Intrakutantests in Zusammenhang stehen. (LIU et al. 2002)

Auch wenn, wie im Fall des Wespengiftes, in dieser Arbeit mit der alleinigen Diagnostik mit dem rekombinanten Allergen rVes v5 88,76 % der Wespengiftallergiker richtig diagnostiziert worden wären, so blieben hier immer noch 11,24 % falsch negativ diagnostizierte Patienten. Es zeigt sich, dass eine Diagnostik alleine mit den rekombinanten Allergenen rApi m1, rVes v5 und rPol d5 noch zu ungenau ist und spezifischen IgE-Antikörper gegen diese rekombinanten Allergene zu einem geringen Teil sowohl bei Bienen- als auch bei

Wespen Giftallergikern vorkommen. Es ist auch nicht möglich eine Allergie aufgrund des Fehlens der spezifischen IgE-Antikörper gegen diese rekombinanten Allergene auszuschließen, da es sich zeigte, dass Allergiker teilweise gar keine spezifischen IgE-Antikörper (0,00 kU/l) gegen die entsprechenden rekombinanten Allergene aufweisen. Es bleibt abzuwarten, ob es gelingen wird, mit weiteren rekombinanten Allergenen eine diagnostische Sicherheit zu erreichen die es möglich macht, zukünftig alle Allergiker richtig zu diagnostizieren. Der Weg ist aus jetziger Sicht nur mittels einer größeren Anzahl und Kombination weiterer rekombinanter Allergene möglich.

Das bessere Verständnis von Allergenen in ihrer Zusammensetzung und ihrer Interaktion mit dem Immunsystem in den letzten Jahren stimmt zuversichtlich. Allergene müssen weiter auf molekularer Ebene entschlüsselt- und die rekombinanten Allergene kommerziell verfügbar werden, um die nötigen unabhängigen Studien durchzuführen. Der Anspruch der CRD ist die *in vitro* Allergiediagnostik und es zeichnet sich ab, dass es in Richtung vollsynthetisch hergestellter fraktionierter Gesamtallergene geht, um die Allergiediagnostik und Therapie zukünftig individueller, nebenwirkungsärmer und effizienter zu machen und dabei höchste Ansprüche an die Zuverlässigkeit in der Diagnostik zu erfüllen.

6. Anhang

6.1. Auswertungstabelle

Patient	Geschlecht	Alter	CAP spez. IgE Biene ngift	CAP spez. IgE Wespe ngift	CAP rApim1	CAP rPold5	CAP rVesv5	Grad der Sympto me	Allergi sch B/W/ nicht/b eide	IC pos/ne g/k.A.	CAST- ELISA pos/ne g/k.A.	rApim1 (kU/l) Bienengi ft	rPold5 (kU/l) Feldwes pengift	rVesv5 (kU/l) Wespen gift
1	2	30	0	0	0	2	2	3	2	1	3	0	0,85	0,75
2	2	58	0	6	0	0	0	2	2	1	3	0,01	0,01	0,01
3	2	16	4	3	3	2	2	2	3	3	3	3,62	1,14	2,02
4	2	32	1	2	0	2	3	2	2	1	3	0,02	2,66	10,8
5	2	53	0	2	0	1	1	3	1000	3	3	0	0,55	0,59
6	2	55	0	2	0	2	3	2	1000	3	3	0	2,21	3,72
7	2	48	0	0	0	0	0	4	1000	3	3	0	0,01	0,02
8	2	44	0	1	0	1	2	3	2	1	3	0,04	0,45	1,01
9	2	41	0	0	0	0	0	2	1000	3	3	0,01	0	0,04
10	2	66	0	0	0	0	2	3	2	1	1	0,01	0,07	1,06
11	2	20	0	0	0	0	0	2	3	2	2	0	0	0
12	2	57	0	0	0	0	0	2	3	2	2	0	0	0
13	2	53	0	2	0	1	1	2	2	1	3	0	0,46	0,66
14	2	43	0	1	0	0	1	1	2	1	3	0	0,17	0,59
15	2	35	3	3	2	0	0	1	1	1	3	2,36	0	0,01
16	2	62	0	0	0	0	0	2	3	2	2	0,02	0,07	0,16
17	2	59	5	2	4	1	2	2	1	1	2	33,1	0,39	1,5
18	2	15	0	0	0	0	1	1	2	2	3	0,02	0,09	0,46
19	2	50	0	0	0	0	0	2	3	2	2	0,01	0,09	0,21
20	2	52	2	4	0	0	0	1	2	1	3	0,04	0,02	0,04
21	2	66	0	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0,06	0,17
22	2	53	0	2	0	1000	3	1	2	1	1	1000	1000	1000
23	2	60	0	2	0	0	2	2	2	1	3	0,02	1000	1,5
24	2	32	2	3	0	3	3	2	2	1	3	0,07	11,9	16,3
25	2	21	2	5	0	3	4	3	2	1	3	0,01	6,05	34,8
26	2	43	0	2	0	1000	3	0	2	2	3	1000	1000	1000
27	2	70	0	2	0	0	3	3	2	1	1	0	0,13	8,42
28	2	57	0	3	0	2	3	3	2	2	3	0,01	1,05	4,16
29	2	13	0	2	0	0	2	2	2	1	3	1000	1000	1000
30	2	40	2	3	1	2	3	2	2	1	3	0,63	2,39	5,77
31	2	20	0	0	0	0	0	1	3	2	2	0	0,01	0,2
32	2	25	0	3	0	3	5	2	2	1	3	0	9,55	52
33	2	43	2	1	0	0	1	3	2	1	1	0,25	0,07	0,58
34	2	75	0	4	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0
35	2	43	5	3	4	2	2	1	1	1	3	29,7	0,9	2,43

36	2	49	2	3	0	3	3	3	2	1	3	0,02	8,41	15,9
37	1	53	0	3	0	1	3	3	2	1	3	0,01	0,5	4,73
38	1	70	0	3	0	4	5	3	2	1	3	0	34,4	71,4
39	1	61	0	2	0	1000	2	1	2	1	3	1000	1000	1000
40	1	49	0	2	0	0	2	0	1000	3	3	0	0,34	2,24
41	1	61	0	4	0	3	5	1	2	1	3	0	6,79	59,2
42	1	30	0	3	0	2	4	3	2	1	3	0	2,41	23,9
43	1	36	2	2	0	2	3	2	2	1	3	0,1	1,26	7,77
44	1	34	2	3	1000	1000	1000	3	2	1	3	1000	1000	1000
45	1	35	0	0	0	0	0	3	2	1	1	0	0,03	0,23
46	1	41	4	2	3	0	0	0	1	1	3	6,52	0,01	0,29
47	1	57	3	3	2	3	4	2	2	1	3	1,14	7,22	21,9
48	1	61	2	3	0	2	3	2	2	1	3	0,01	1,16	7,95
49	1	50	0	3	0	4	4	1	2	1	3	0,01	21,4	38
50	1	8	0	2	0	0	2	2	2	1	3	0	0,18	1,94
51	1	56	0	3	0	2	3	2	2	1	3	1000	1000	1000
52	1	44	1	1	0	1	1	3	2	1	3	0,09	0,36	0,55
53	1	61	4	2	3	3	3	3	2	2	3	3,95	4,04	6,08
54	1	66	0	0	0	2	2	2	2	1	1	0	0,86	2,13
55	1	66	0	1	0	1	2	2	2	2	3	0,01	0,57	0,82
56	1	59	0	2	0	3	3	2	2	1	3	0	4,86	7,31
57	1	42	3	3	0	2	2	2	2	1	3	0,11	2,21	3,17
58	1	50	0	2	0	2	2	1	2	1	3	0,01	1,01	2,11
59	1	26	3	2	0	2	3	1	2	1	3	0,06	1,91	6,37
60	1	62	2	3	0	4	4	3	1000	3	3	0	24,5	32,6
61	1	43	2	0	2	0	0	2	1	1	3	3,5	0,05	0,08
62	1	60	2	5	0	2	3	1	2	1	3	0,05	2,35	7,43
63	1	42	3	3	0	2	2	1	2	1	3	0,18	0,91	1,54
64	1	67	0	2	0	0	2	2	2	2	3	0	0,21	1,39
65	1	43	2	2	2	1	2	3	4	1	3	0,74	0,42	1,15
66	2	59	0	1	0	0	2	2	2	1	1	0	0,17	1,26
67	2	73	0	2	0	0	1	3	2	2	3	0	0,14	0,35
68	1	53	0	2	0	0	2	1	2	1	3	0	0,01	1,2
69	1	15	3	0	2	0	0	2	1	1	3	1,39	0,01	0,12
70	1	50	2	2	0	2	2	2	2	1	3	0	3,43	3,26
71	1	47	0	1	0	1	2	3	2	1	3	0	0,38	0,83
72	1	46	0	3	0	1	2	3	2	1	3	0	0,4	3,31
73	1	44	0	2	0	3	3	2	2	1	3	0,01	11,9	13,6
74	1	42	2	2	0	2	3	2	2	1	3	0,01	3,21	4,28
75	1	53	1	0	0	1	2	2	2	1	3	0,02	0,45	1,83
76	1	60	0	2	0	0	2	3	2	1	3	0,01	0,16	1000
77	1	51	3	2	3	0	0	1	1	2	1	5,47	0,01	0,01
78	2	50	0	1	0	0	3	3	2	1	3	0	0,06	7,28
79	2	43	0	0	0	1	2	2	2	1	1	0	0,62	1,08

80	1	59	0	3	0	2	3	2	2	1	3	0,06	2,04	13
81	1	58	0	4	0	2	3	2	2	1	1	0	2,39	6,97
82	2	25	1	0	0	0	0	2	1000	3	3	0,04	0,02	0,01
83	1	51	0	2	0	2	3	0	2	3	3	0	0,91	5,3
84	1	56	0	2	0	3	3	1	2	1	1	0	10,7	16,7
85	1	39	3	2	2	2	2	1	4	1	3	0,92	0,93	2,63
86	1	56	3	3	0	3	3	2	1000	3	3	0,01	5,03	8,83
87	1	24	0	3	0	3	3	2	2	1	3	0,01	5,17	9,73
88	2	56	0	2	0	0	0	2	2	2	3	0	0,29	0,1
89	2	43	0	1	0	4	4	2	2	1	2	0	25,9	43,6
90	2	64	2	2	0	2	3	2	2	1	3	0	3,39	7,49
91	2	58	3	3	1000	0	2	1	2	1	1	1000	0,08	1,33
92	2	55	4	0	4	0	0	2	1	1	3	20	0	0,01
93	2	54	0	2	0	2	4	3	2	1	2	0	2,96	21,1
94	2	82	0	2	0	2	3	2	2	2	3	0,01	0,81	7,55
95	1	71	3	3	0	4	4	2	2	1	3	0,03	22,7	28,5
96	1	26	0	1	0	0	0	2	2	1	1	0	0,05	0,09
97	1	62	0	1	0	0	0	2	2	2	3	0,02	0,04	0,31
98	1	41	2	3	0	3	5	3	2	1	1	0,02	15,2	57
99	1	55	0	1	0	0	0	2	2	2	3	0	0,01	0,19
100	1	56	3	2	1	0	0	3	4	1	3	0,63	0	0,01
101	1	46	2	4	0	2	2	3	2	1	1	0,01	0,78	3,15
102	1	68	0	1	0	1	2	3	2	1	3	0	0,46	0,79
103	2	67	0	2	0	2	2	2	2	1	3	0	1,01	2,92
104	2	66	0	2	0	0	2	2	2	1	3	0	0,27	1,04
105	2	44	0	0	0	3	3	2	2	1	3	0	7,64	8,83
106	2	50	0	3	0	0	3	2	2	1	3	0,01	0,32	5,91
107	2	49	2	1	2	0	2	2	1	2	3	0,81	0,23	1,7
108	2	68	3	3	1	2	2	2	2	1	3	0,41	2,44	3,15
109	2	55	0	2	0	0	1	2	2	1	3	0,01	0,17	0,41
110	2	68	0	0	0	1	2	3	2	1	3	0	0,54	0,99
111	2	40	0	2	0	2	3	2	1	1	3	0,01	1,46	4,53
112	2	69	0	2	0	2	3	2	2	2	3	0	2,41	3,55
113	2	55	0	3	0	3	6	2	2	1	3	0	13	101
114	2	50	0	2	0	4	4	1	2	1	3	0,01	24,4	32,7

Tab.13: Individuelle Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten**Geschlecht:** (1 = männlich, 2= weiblich)**Allergisch:** (1 = Biene, 2= Wespe, 3= nicht allergisch, 4= Biene und Wespe)**IC = Intrakutantest:** (1= positiv, 2=negativ, 3= keine Angabe)**CAST-ELISA:** (1=positiv, 2=negativ, 3= keine Angabe)**Der Wert 1000 steht generell für k.A. (keine Angabe)**

6.2. Abkürzungen

cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CRD	Component Resolved Diagnosis
CCD	cross-reactive carbohydrate determinants
IgE	Immunglobulin E
SIT	spezifische Immuntherapie bzw. Hyposensibilisierung
CAST	cellular antigen stimulation test
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ACE-Hemmer	Hemmer des Angiotensin Converting Enzyme
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
CAP	Capacity
EIA	enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
WHO	World Health Organisation
IL-3	Interleukin-3
IC-Test	Intrakutantest

7. Literaturverzeichnis

1. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. (1983) Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* **302(5911)**:832-7.
 2. Auriault C, Gras-Masse H, Wolowczuk I, Pierce RJ, Balloul JM, Neyrinck JL, Drobecq H, Tartar A, Capron A. (1988) Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J Immunol* **141(5)**:1687-94.
 3. Bilò MB, Ruëff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JN. (2005) Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* **60**: 1339–49
 4. Bonifazi F, Jutel M, Bilò BM, Birnbaum J, Müller U (2005) Prevention and treatment of Hymenoptera venom allergy : guidelines for clinical practice *Allergy* **60**: 1459-70
 5. Burnet FM. (1957) Biology and medicine. *Med J Aust* **44(13)**:406-10.
 6. Comaish JS (1965) The role of the mast cells and basophils in hypersensitivity. *Br J Dermatol* **77**:92-7.
 7. Cook EB, Stahl JL, Barney NP, Graziano FM. (2002) Mechanisms of antihistamines and mast cell stabilizers in ocular allergic inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **1(2)**:167-80.
 8. Coutinho AE, Chapman KE. (2011) The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* **335(1)**:2-13
 9. Dusemund B, Barrach HJ. (1982) Double-antibody enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of collagen types I and II. *J Immunol Methods* **50(3)**:255-68.
-

10. Eberlein B, Krischan L, Darsow U, Ollert M, Ring J. (2012) Double positivity to bee and wasp venom: improved diagnostic procedure by recombinant allergen- based IgE testing and basophil activation test including data about cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol* **130(1)**:155-61.
 11. Engvall E, Perlmann P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8(9)**:871-4.
 12. Fagraeus A. (1948) The plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *J Immunol* **58(1)**:1-13
 13. Fang KS, Vitale M, Fehlner P, King TP. (1988) cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85(3)**:895-9.
 14. Feldmann M, Basten C (1972) Cell interactions in the immune response in vitro. 3. Specific collaboration across a cell impermeable membrane. *J Exp Med* **136(1)**:49-67.
 15. Frick G, Frick U (1967) On the role of basophils and mast cells in fibrinolysis and allergy. II. Effect of an antihistaminic and an allergic immediate reaction on the number and degranulation of basophil leukocytes. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* **87(3)**:178-89.
 16. Gell PGH, Coombs RRA, (1963) Clinical Aspects of Immunology. 1. Auflage 1963; Oxford, Blackwell Verlag.
 17. Gespach C, Fagot D, Emami S. (1989) Pharmacological control of the human gastric histamine H2 receptor by famotidine: comparison with H1, H2 and H3 receptor agonists and antagonists. *Eur J Clin Invest* **19(1)**:1-10.
-

-
18. Guerti K, Bridts CH, Stevens WJ, Ebo DG. (2008) Wasp venom-specific IgE: towards a new decision threshold? *J Investig Allergol Clin Immunol* **18(4)**:321-3
19. Haahtela T, Suoniemi I, Jaakonmäki I, Björkstén F. (1982) Relationship between serum IgE concentration and occurrence of immediate skin test reactions and allergic disorders in young people. *Allergy* **37(8)**:597-602.
20. Heinig JH, Engel T, Weeke ER. (1988) Allergy to venom from bee or wasp: the relation between clinical and immunological reactions to insect stings. *Clin Allergy* **18(1)**:71-8.
21. Hemmer W. (2008) Cross-reactivity to honeybee and wasp venom. *Hautarzt* **59(3)**:194-9.
22. Jerne NK. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* **125C(1-2)**:373-89.
23. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62(6)**:1189-204.
24. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. (1975) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* **5(2)**:117-21.
25. Kneass SS, Evans JS. (1909) The quantitative Relations of Antigen, amboceptor, and Complement in the Estimation of Hemolysis. *J Med Res* **20(3)**:203-27.
26. Köhler J, Blank S, Müller S, Bantleon F, Frick M, Huss-Marp J, Lidholm J, Spillner E, Jakob T. (2014) Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* **133(5)**:1383-9, 1389.e1-6.
-

-
27. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Eržen R, Zidarn M, Košnik M. (2011) Low sensitivity of commercially available rApi m 1 for diagnosis of honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* **128(3)**:671-3
28. Korošec P, Valenta R, Mittermann I, Celesnik N, Silar M, Zidarn M, Košnik M. (2012) High sensitivity of CAP-FEIA rVes v 5 and rVes v 1 for diagnosis of *Vespula* venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* **129(5)**:1406-8
29. Liu Z, Zhang Z, Feng Z. (2002) The correlation analysis of the reactive intensity of intradermal test for allergens and the concentration of specific IgE in serum. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* **16(2)**:60-1
30. Marrack JR. (1934) Derived Antigens as a Means of Studying the relation of Specific Combination to Chemical Structure: (Section of Therapeutics and Pharmacology). *Proc R Soc Med* **27(8)**:1063-5
31. Miller JF (1961) Immunological function of the thymus. *Lancet* **2(7205)**: 748-9.
32. Moser M, Cramer R, Brust E, Suter M, Menz G. (1994) Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *J Allergy Clin Immunol* **93(1 Pt 1)**:1-11.
33. Müller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. (2009) Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* **64 (4)**:543-8.
34. Müller UR, Johansen N, Petersen AB, Fromberg-Nielsen J, Haeberli G. (2009) Hymenoptera venom allergy: analysis of double positivity to honey bee and *Vespula* venom by estimation of IgE antibodies to species-specific major allergens Api m1 and Ves v5. *Allergy* **64 (4)**:543-8.
-

-
35. Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth MT, Valent P et al. (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(Suppl 2):14677–14682.
36. Noon L. (1911) Prophylactic inoculations against hay fever. *Lancet* **1**:1572–1573.
37. Porter RR (1963) Chemical structure of gamma-globulin and antibodies. *Br Med Bull* **19**:197-201.
38. Przybilla B, Ring J, Ruëff F. (2007) Anaphylaxie – Klinisches Bild und Diagnose. *Hautarzt* **58**(12): 1025–31
39. Przybilla B, Ruëff F. (2010) Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges.* **8**(2):114-27
40. Przybilla B, Franziska Ruëff, Annett Walker, Helen-Caroline Räwer, Werner Aberer, Carl Peter Bauer, Dietrich Berdel, Tilo Biedermann, Knut Brockow, Johannes Forster, Thomas Fuchs, Eckard Hamelmann, Thilo Jakob, Reinhart Jarisch, Hans F. Merk, Ulrich Müller, Hagen Ott, Wolfgang Sitter, Radvan Urbanek, Bettina Wedi (Leitlinien 2011) Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespenallergie. *Allergo J* **20**: 318-39
41. Ring J, Messmer K.(1977) Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* **1**: 466-9.
42. Ring J, Brockow K, Duda D, Eschenhagen T, Fuchs Th, Huttegger I, Kapp A, Klimek L, Müller U, Niggemann B, Pfaar O, Przybilla B, Rebien W, Rietschel E, Ruëff F, Schnadt S, Tryba M, Worm M, Sitter H, SchultzeWerninghaus G. (2007) Akuttherapie anaphylaktischer Reaktionen. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für
-

-
- Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und der Deutschen Akademie für Allergologie und Umweltmedizin (DAAU). *Allergo J* **16**: 420–34
43. Ruëff F, Przybilla B. (2005) Nebenwirkungen und Erfolg der Insektengifthyposensibilisierung. *Allergo J* **14**: 560–8
44. Ruëff F, Placzek M, Przybilla B. (2006) Mastocytosis and Hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6(4)**:284-8.
45. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U, Scheipl F, Aberer W, Birnbaum J, Bodzenta-Lukaszyk A, Bonifazi F, Bucher C, Campi P, Darsow U, Egger C, Haeberli G, Hawranek T, Körner M, Kucharewicz I, Küchenhoff H, Lang R, Quercia O, Reider N, Severino M, Sticherling M, Sturm GJ, Wüthrich B. (2009) Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase-a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* **124(5)**:1047-54
46. Ruëff F, Karl-Christian Bergmann, Knut Brockow, Thomas Fuchs, Armin Grübl, Kirsten Jung, Ludger Klimek, Horst Müsken, Oliver Pfaar, Bernhard Przybilla, Helmut Sitter, Wolfgang Wehrmann (2009) Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttyp-Reaktionen
Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) in Abstimmung mit dem Ärzteverband Deutscher Allergologen (ÄDA), dem Berufsverband Deutscher Dermatologen (BVDD), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und Kopf- und Hals-Chirurgie (DGHNOKHC), der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) und der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA)
47. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N. (1996) T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* **9(2)**:211-20.
-

-
48. Saslaw S, Wilson HE, Doan CA, Woolpert OC, Schwab JL (1946) Reactions of monkeys to experimentally induced influenza virus A infection: an analysis of the relative roles of humoral and cellular immunity under conditions of optimal or deficient nutrition. *J Exp Med* **84(2)**:113-25
49. Schäfer T (2009) Epidemiologie der Insektengiftallergie. *Allergo J* **18**: 353–8
50. Scherer K, Weber JM, Jermann TM, Krautheim A, Tas E, Ueberschlag EV, Cammarata M, Bircher AJ (2008) Cellular in vitro assays in the diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Int arch Allergy Immunol* **146**: 122-32
51. Shiku H, Kisielow P, Bean MA, Takahashi T, Boyse EA, Oettgen HF, Old LJ. (1975) Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J Exp Med* **141(1)**:227-41.
52. Sturm GJ, Schuster C, Kranzelbinder B, Wiednig M, Groselj-Strele A, Aberer W. (2009) Asymptomatic sensitization to Hymenoptera venom is related to total immunoglobulin E levels. *Int Arch Allergy Immunol* **148**: 261–4
53. Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. (1974) Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71(10)**:4027-31.
54. Valenta R, Campana R, Marth K, van Hage M. (2012) Allergen-specific immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches. *J Intern Med* **272(2)**:144-57
55. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, Villalba M, Durham SR, Becker WM, Aalbers M, André C, Barber D, Cistero Bahima A, Custovic A, Didierlaurent A, Dolman C, Dorpema JW, Di Felice G, Eberhardt F, Fernandez Caldas E, Fernandez Rivas M, Fiebig H, Focke M, Fötisch K, Gadermaier G, Das RG, Gonzalez Mancebo E, Himly M, Kinaciyan T, Knulst
-

AC, Kroon AM, Lepp U, Marco FM, Mari A, Moingeon P, Monsalve R, Neubauer A, Notten S, Ooievaar-de Heer P, Pauli G, Pini C, Purohit A, Quiralte J, Rak S, Raulf-Heimsoth M, San Miguel Moncin MM, Simpson B, Tsay A, Vailes L, Wallner M, Weber B. (2008) The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* **63**(3):310-26.

56. Yavuz ST, Sahiner UM, Buyuktiryaki B, Soyer OU, Sackesen C, Sekerel BE, Tuncer A. (2013) Clinical features of children with venom allergy and risk factors for severe systemic reactions. *Int Arch Allergy Immunol* **160**(3):313-21

57. Yunginger JW, Gleich GJ (1975) The impact of the discovery of IgE on the practice of allergy. *Pediatr Clin North Am* **22**(1):3-15.

58. Zinkernagel RM. (1976) T helpers may be sensitized by antigen-specifically altered structures, which are coded by the I region of the H-2 gene complex. *Adv Exp Med Biol* **66**:527-30.

8. Dank

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Claudia Pföhler danke ich für die Überlassung des Themas.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Rebecca Körner danke ich für ihre Unterstützung in allen Phasen der Arbeit, sowie vielen Anregungen, die eine große Hilfe beim Schreiben waren. Der herzliche Umgang, der von Anfang an herrschte, war ebenfalls sehr förderlich, wofür ich mich auch noch einmal ausdrücklich bedanken möchte.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie danke ich für die Unterstützung bei der Durchsicht der Akten und der angenehmen und freundlichen Arbeitsatmosphäre.

Herrn PD Dr. Stefan Gräber danke ich für die Einführung in das SPSS – Programm und Hilfen bei der statistischen Auswertung.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Kurt Reinhard Küffner und Patricia Anne Becker, sowie meiner Schwester Fiona Christine Küffner danke ich für die tolle Unterstützung in jeder Hinsicht während meines gesamten Studiums. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Abschließend geht ein besonderer Dank an meine Freundin Uta Herdis Müller für die liebevolle Unterstützung und Kraft beim Schreiben dieser Arbeit und während des gesamten Studiums, sowie in allen Lebenslagen.
